



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

REC'D 02 MAR 2004

WIPO PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200300206, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 28 de Enero de 2003.

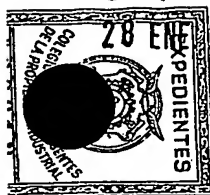
Madrid, 16 de Febrero de 2004

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

CARMEN LENCE REIJA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD **P200300206**

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICION A LA PATENTE

☐ SOLICITUD PROVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN

MODALIDAD

N.º SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LA O.E.P.M.
03 ENE 28 11:44

FECHA Y HORA PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACION:

MADRID

CODIGO

218

(5) SOLICITANTES: APELLIDOS O DENOMINACION SOCIAL
EFARMES, S.A.

NOMBRE

NACIONALIDAD
ESPAÑOLA

CODIGO PAIS
ES

DNI/CIF

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO **SARDENYA, 350**

LOCALIDAD **BARCELONA**

PROVINCIA

PAIS RESIDENCIA **ESPAÑA**

NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

TELÉFONO

FAX

CORREO ELECTRÓNICO

CODIGO POSTAL

08025

CODIGO PAIS

ES

CODIGO PAIS

ES

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CODIGO

1- **MATA LÓPEZ**

2- **ALONSO KARLEZI**

3- **MOZAS ALONSO**

4- **REYES LEAL**

**PEDRO
RODRIGO ALBERTO
PILAR
GILBERTO**

**ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA**

**ES
ES
ES
ES**

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O EL ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☐ INVENC. LABORAL

☒ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

"PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR"

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI ☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAIS DE ORIGEN

CODIGO PAIS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/1986 DE PATENTES ☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

IGNACIO DIEZ DE RIVERA ELZABURU (891(5)) Colegiado número 585

Miguel Ángel 21 28010 - Madrid España

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN N.º DE PÁGINAS: **45**

☒ N.º DE REIVINDICACIONES: **16**

☒ DIBUJOS. N.º DE PÁGINAS: **3**

☒ LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS: **70**

☐ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS Documentos de cesión y disquete

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

IGNACIO DIEZ DE RIVERA ELZABURU
por mi compañero

(VER COMUNICACIÓN AL DORSO)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art.81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200300206

FECHA DE PRESENTACIÓN

28 ENE. 2003

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de veintinueve mutaciones causantes de hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "biochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas veintinueve mutaciones en el ADN.

GRÁFICO

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO

(VER INFORMACIÓN AL DORSO)



(12)

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD
P200300200

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN
28 ENE. 2003

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(71) SOLICITANTE (S) **EFARMES, S.A.**

DOMICILIO **Sardenya, 350
08025 Barcelona, España**

NACIONALIDAD **española**

(72) INVENTOR (ES) **PEDRO MATA LÓPEZ, RODRIGO ALBERTO ALONSO KARLEZI, PILAR MOZAS ALONSO,
GILBERTO REYES LEAL, MIGUEL POCOVÍ MIERAS, SERGIO CASTILLO FERNÁNDEZ, DIEGO TEJEDOR
FERNÁNDEZ y ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCION

**"PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MU-
TACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RE-
CEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R)
ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR"**

(57) RESUMEN

La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de veintinueve mutaciones causantes de hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "blochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas veintinueve mutaciones en el ADN.

**PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN
SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS
DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.**

5

Ambito de la invención

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico in vitro, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante técnicas de ingeniería genética, para determinar la predisposición de un individuo al desarrollo de la enfermedad denominada hipercolesterolemia familiar.

10

Antecedentes de la invención

La aterosclerosis se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una combinación de cambios que se produce en la íntima de las arterias a consecuencia de un acúmulo focal de lípidos y componentes complejos que se acompaña con la formación de tejido fibroso y calcificación que a su vez se asocia con cambios en estructura de la media.

15

La aterosclerosis puede considerarse como una forma especial de arteriosclerosis con un depósito patogénico de lípidos en la pared arterial. La mayoría de formas de la arteriosclerosis implican la degeneración grasa de la pared vascular, con lo que el término arteriosclerosis y aterosclerosis suele utilizarse de forma indistinta (Assmann G. in "Lipid Metabolism and Atherosclerosis" Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart 1982:1).

20

Los lípidos son sustancias insolubles en disoluciones acuosas. Las lipoproteínas son las partículas que posibilitan el transporte de los lípidos en la sangre. Las lipoproteínas se dividen en varias categorías según su densidad dependiendo de como pueden separarse por ultracentrifugación. (Havel RJ y col. J Clin Invest 1955, 34:1345). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ($d=1.019-1.063$ g/mL) son las que mayoritariamente transportan el colesterol en el torrente circulatorio. Estas lipoproteínas están formadas por el 75% de lípidos (principalmente colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos), alrededor el 70 % del colesterol total de la sangre es transportado por las partículas LDL.

30

El término hipercolesterolemia se utiliza para reflejar la elevación del colesterol del plasma por encima de los niveles considerados normales para una determinada población y es uno de los factores cruciales para el inicio y progresión de la arteriosclerosis. Más de la mitad de todas las muertes que se producen en los países desarrollados están relacionados con la enfermedad cardiovascular arteriosclerosa (Murray CJL y Lopez AD. Lancet 1997; 349:1269-1276).

Las hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones que se producen en el gen del receptor de las LDL (r-LDL), este gen codifica una proteína que permite la captación y degradación intracelular de las LDL (Goldstein JL, y Brown MS Ann Rev Cell Biol 1985; 1:1-39).

La penetrancia de la HF es cercana al 100% lo que significa que la mitad de la descendencia de una persona afectada tendrá su colesterol plasmático muy elevado desde el momento de nacer, afectando por igual a hombres y mujeres (Goldstein JL, Brown MS. The metabolic basis of inherited disease. Editores: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. McGraw Hill New York 6th edition, 1989; 1215-1250).

Los pacientes con HF presentan como síntomas característicos clínicos arco corneal, xantomas tendinosos y enfermedad coronaria prematura (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). La HF es una de las enfermedades monogénicas mas frecuentes con una prevalencia estimada de pacientes heterocigotos de una en cada 500 personas y de heterocigotos de una en cada 1.000.000 .

Determinadas poblaciones tales como los canadienses de habla francesa (Leitersdorf E y col. J Clin Invest 1990; 85:1014-1023), cristianos libaneses (Lehrman MA y col. J Biol Chem 1987; 262:401-410), drusos (Landsberger D y col. Am J Hum Genet 1992; 50: 427-433) finlandeses (Koivisto UM y col. J Clin Invest 1992; 90:219-228), los "afrikaners" de Surafrica (Kotze MJ y col. Ann Hum Genet 1991; 55:115-121), los judíos Ashkenazi de descendencia lituana (Meiner V y col. Am J Hum Genet 1991; 49:443-449) presentan la particularidad que solo tienen unas pocas mutaciones responsables de la HF, esto es consecuencia de un efecto fundador y por lo tanto la frecuencia de heterocigotos en estas poblaciones es mas alta que lo estimado para otras poblaciones.

Los pacientes con HF presentan una concentración de colesterol en plasma muy elevada, por regla general superior al percentil 95. La mortalidad de los pacientes con HF, ajustada por edad y sexo, es entre cuatro y cinco veces mas alta que en la población general (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). Los pacientes que heredan dos mutaciones en el locus del gen del r-LDL se denominan HF homocigotos o HF heterocigotos compuestos en cuyo caso prácticamente no hay receptores funcionales lo que condiciona que la concentración de c-LDL se eleve entre seis y ocho veces en relación a la considerada normal. La mayoría de pacientes de esta categoría presentan enfermedad coronaria antes de los 20 años (Goldstein JL y col. N Engl J Med 1983; 309:288-296). Si los pacientes homocigotos o los heterocigotos fueran diagnosticados antes de que presentaran signos de enfermedad coronaria y tratados de forma preventiva su riesgo de infarto de miocardio se vería reducido de forma sustancial

El r-LDL es una glicoproteína ubicua de membrana de 839 aminoácidos que capta e internaliza partículas LDL por un mecanismo denominado de endocitosis (Goldstein J. y Brown M. J Biol Chem 1974; 249:5153-5162) (Figura 1). El gen del r-LDL se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 19 región p13.1-13.3 (Yamamoto T y col. Cell 1984;39: 27-38), tiene un tamaño de 45.000 pares de bases (pb). Este gen consta de 18 exones y 17 intrones los cuales codifican los seis dominios funcionales de la proteína: El péptido señal, el dominio de unión del ligando, el dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la zona de glicosilación, el dominio transmembrana y el citoplásmico (Sundhof T y col. Science 1985; 228:893-895) (Figura 2).

La síntesis de r-LDL se encuentra regulada por un sofisticado mecanismo de retroalimentación que controla la transcripción del gen del r-LDL en función de las variaciones de la concentración intracelular de esteroides y la demanda celular de colesterol (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262:10773-10779). Las secuencias del ADN necesarias para la regulación de la transcripción del gen del r-LDL están situadas en una región de 177 pb de la zona promotora (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262: 10773-10779). Esta región contiene todos los elementos en cis que permiten la expresión basal así como la regulación por esteroides y contiene tres repeticiones de 16 pb cada una. La repetición 1 y 3 contienen un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y son

esenciales para que se produzca la expresión basal del gen pero requieren de la contribución de la repetición 2 para la expresión completa (Dawson PA y col. J Biol Chem 1988; 263:3372-3379). La repetición 2 incluye un elemento de regulación por esteroides de 10 pb, SRE-1 (Smith JR y col. J Biol Chem 1990; 265:2306-2310) que
5 posibilita la unión del factor de transcripción denominado SREBP-1 el cual aumenta la transcripción cuando la concentración de esteroides intracelulares disminuye. Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones situadas en los elementos reguladores de la transcripción del receptor LDL (Hobbs HH, y col al. Hum Mutat 1992; 1:445-466; Koivisto UM. Y col Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91:10526-10530), Mozas P, y col J
10 Lipid Res 2002; 43:13-18, <http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).

El exón 1 codifica el péptido señal el cual consiste en una secuencia de 21 amino ácidos que es eliminado de la proteína durante la translocación que tiene lugar en el retículo endoplásmico. Se han descrito varias mutaciones en este exón que incluyen cambios de pauta de lectura, cambios de aminoácido o codones de parada
15 (<http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).

Los exones del 2 al 6 codifican el dominio de unión al ligando, el cual consta de siete repeticiones en tandem de 40 amino ácidos. La estructura de este dominio ha sido resuelta de forma parcial (Jeon H y col. Nature Struct Biol 2001; 8:499-5049). En cada repetición tiene una agrupación de aminoácidos cargados negativamente Asp-X-Ser-Asp-
20 Glu y seis restos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro.

El segundo dominio del r-LDL consta de una secuencia de 400 amino ácidos codificada por los exones 7 al 14. Esta secuencia tiene un 33% de homología con el factor precursor del crecimiento de la epidermis (EGFP). Al igual que el dominio de unión al ligando, esta región, contiene tres repeticiones de 40 amino ácidos con
25 secuencias ricas en cisteína. Las dos primeras repeticiones, denominadas A y B, son contiguas y están separadas de la tercera repetición por una región de 280 amino ácidos que contiene cinco copias de la secuencia YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp). El dominio análogo al EGFP es fundamental para la disociación ácida del r-LDL de las partículas recubiertas de clatrina que tiene lugar en el endosoma durante el proceso de reciclado del
30 receptor. De todas las mutaciones descritas hasta la fecha, aproximadamente el 55% están localizadas en la región homóloga EGFP y el 35% están localizadas en las repeticiones YWTD (<http://www.ucl.ac.uk/fh>).

El tercer dominio del r-LDL, codificado por el exón 15, es una región en la que abundan los amino ácidos treonina y serina. La función de este dominio se desconoce, pero se sabe que en esta región están anclados las cadenas de carbohidratos. Esta zona está muy poco conservada en seis especies analizadas y se cree que desempeña una función estabilizadora del receptor. (Goldstein y col. En *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Editores Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7th Edition. McGraw Hill, 1995: 1981-2030).

El dominio transmembrana consta de 22 amino ácidos hidrofóbicos codificados por el exón 16 y el extremo 5' del exón 17. Este dominio es esencial para el anclaje del receptor a la membrana celular.

El dominio citoplásmico del r-LDL, está formado por una secuencia de 50 amino ácidos codificada por la región 3' del exón 17 y la 5' del exón 18. Este dominio contiene dos secuencias señal que permiten dirigir a la proteína a la superficie celular y situar al receptor en las partículas revestidas (Yokode M, y col. *J Cell Biol* 1992;117: 39-46). Este dominio es uno de los más conservados, con un porcentaje de aminoácidos conservados del 86% entre seis especies analizadas.

Las mutaciones del r-LDL que se han encontrado en pacientes con HF se clasifican en 5 clases: alelos nulos, defectuosos en el transporte, defectuosos en la unión, en la internalización y reciclado. Por regla general cada categoría está asociada con mutaciones localizadas en una región del gen que codifican un dominio particular de la proteína. (Hobbs HH, et al. *Hum Mutat* 1992; 1:445-466).

La heterogeneidad que presentan los pacientes con HF en cuanto a los niveles plasmáticos de colesterol ligado a LDL (C-LDL) y enfermedad coronaria se debe en parte a diferencias en cuanto al tipo de mutación (Sun XM y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13:1680-1688, Kotze y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13:1460-1468; Gudnason V y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997;17:3092-3101). Por otra parte, el descenso que se produce en la concentración del c-LDL en pacientes HF heterocigotos tras el tratamiento con inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa depende, en parte, de la naturaleza de la mutación del gen r-LDL (Leisterdorf E y col. *Circulation* 1993; 87:35-44; Jeenah M y col. *Atherosclerosis* 1993; 98:51-58, Sijbrands EJG y col. *Atherosclerosis* 1998;136: 247-254).

El principal ligando del receptor es la partícula LDL la cual contiene una sola copia de una proteína denominada la apolipoproteína B-100 (ApoB-100) (Goldstein J y Brown. M J Biol Chem 1974;249:5153-5162). Esta apolipoproteína tiene una zona en la que abundan los aminoácidos básicos y es el lugar donde se une al receptor (Borén J y col. J Clin Inves 1998; 101: 1084-1093). Se han encontrado varias mutaciones en el gen de la apoB-100 que alteran la funcionalidad de la proteína y disminuyen la capacidad de retirada de las partículas LDL, dando como resultado el acúmulo de c-LDL en plasma. Hasta la fecha se han descrito cuatro mutaciones en el gen de apo B-100 que cursan con una hipercolesterolemia que se denomina apolipoproteína B defectuosa familiar (BDF), todas estas mutaciones se encuentran localizadas en el dominio de unión de la apo-B100; amino ácidos 3130-3630: R3480W, R3500Q, R3500W y R3531C (Soria L y col. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 587-591; Pullinger CR, y col. J Clin Invest 1995; 95:1225-1234; Gaffney D, y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1025-1029; Boren J, y col. J Biol Chem 2001; 276:9214-9218). Una mutación que cambia el codón de la posición 3500 CGG por CAG dando lugar a una sustitución de una Glutamina por Arginina (R3500Q), es la mas frecuente de todas las que cursan con BDF. Los pacientes heterocigotos para la mutación apo B-3500 son por regla general hipercolesterolemicos, aunque su concentración de colesterol total plasmático varía dentro del rango observado en pacientes con HF hasta concentraciones moderadamente elevadas. (Tybjaerg-Hansen A, y col. Atherosclerosis 1990; 80:235-242; Hansen PS, y col. Arterioscl Throm Vasc Biol 1997; 17:741-747). Dado que las características y bioquímicas de estos pacientes son muy similares, el diagnóstico diferencial entre los pacientes con BDF o HF sólo es posible a través del diagnóstico genético molecular.

El diagnóstico clínico de la HF se fundamenta en los datos analíticos de lípidos y lipoproteínas del plasma, sintomatología clínica (xantomas) e historia familiar y personal de enfermedad coronaria. La OMS a través de su programa MedPed recomienda una serie de criterios a seguir para llevar a cabo el diagnóstico clínico de HF. Estos criterios basados en una puntuación que depende de la historia personal y familiar de hipercolesterolemia características clínicas y analítica del paciente. Cuando la puntuación que alcanza el paciente es igual o superior a 8 puntos el criterio clínico de diagnóstico de HF se clasifica como "seguro", entre 5 y 8 puntos de "probable" y entre 3 y 5 puntos de "posible" (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The

International MedPed FH Organization, Geneva 1998). Sin embargo, algunos pacientes no cumplen con los criterios de HF porque la historia familiar es incompleta o desconocida, o bien porque en el momento del análisis solo presentan concentraciones moderadas de colesterol plasmático y carecen de signos de depósito de colesterol en tejidos, tales como xantomas tendinosos, arco corneal o xantelasmas.

En familias cuyo mutación del gen del r-LDL se conoce se ha demostrado que el mejor "punto de corte" para el diagnóstico es el utilizar el percentil 90 para la concentración de c-LDL (Umans-Eckenhause MAW y col. Lancet 2001; 357:165-168. Sin embargo, el 18% de los pacientes portadores de la mutación presentan una concentración de colesterol total por debajo de este percentil, por otra parte, la proporción de falsos positivos fue también del 18%. Por lo tanto, se comete porcentaje alto de diagnósticos equivocados si se utiliza solo la cifra de colesterol plasmático. Se ha publicado, que más del 50% de los pacientes con HF no reciben tratamiento farmacológico hipolipemiante ni consejo dietético como consecuencia de no haber sido diagnosticados correctamente como pacientes con HF (Williams RR y col. Am J Cardiol 1993; 72:18D-24D).

El conocimiento de las bases moleculares de la HF ha permitido que se pueda realizar el diagnóstico inequívoco a nivel del ADN en la gran mayoría de casos: la demostración de un defecto molecular en el gen del r-LDL constituye una confirmación definitiva del diagnóstico (Familiar Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). El diagnóstico preciso de la HF es posible utilizando métodos de biología molecular, sin embargo, en la actualidad su utilidad en poblaciones heretogéneas se encuentra limitada debido a la gran heterogeneidad de las mutaciones del gen del r-LDL.

En la solicitud PCT WO-88/03175 (Biotechnology Research Partners, Ltd.) se reivindica un método para el diagnóstico de la aterosclerosis, que se basa en la detección de la presencia o ausencia de varios polimorfismos en la región génica de la apolipoproteína AI-CIII-AIV, o en los genes apoB, apoCI, apoAII, así como en el gen del receptor de LDL. Concretamente para este gen, se presenta el empleo de los polimorfismos Cfr131 y BstEII.

Otro documento de interés es la patente japonesa JP-10099099 que, se refiere al empleo de una mutación en el triplete codificante del aminoácido 109, en concreto la

inserción de una C, para el diagnóstico de anomalías en el gen del receptor de LDL, aunque no se menciona concretamente la hipercolesterolemia familiar.

Finalmente, las patentes norteamericana US-4.745.060 y US-4.966.837, ambas de la Universidad de Texas, presentan métodos para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar basándose en mutaciones en el gen del receptor de LDL. Sin embargo, lo que se reivindica en la primera de ellas son secuencias correspondientes al gen "normal", presentando un ejemplo puntual de una mutación que se define por el cambio del mapa de restricción con Xba I. En la segunda patente, por su parte, se reivindica el empleo de varias enzimas de restricción (Eco RI, Asp 718, Taq I, Bam HI, Xba I, Inf. I, Bgl II, Cla I, Eco RV, Kpn I, Pvu II, Sph I, Sst I, Sst II, Stu I, Xho I, Nde I y Nsi I) en un método para determinar mutaciones en el gen r-LDL, que se basa en observar la alteración del modelo de restricción con estas enzimas frente al modelo correspondiente al gen normal.

El documento de patente más próximo a la invención es WO02/06467, en el que se describe un método de detección de errores en el metabolismo lipídico basado en una serie de mutaciones y polimorfismos del gen r-LDL. Sin embargo, ninguna de las mutaciones ni polimorfismos descritos en dicha patente coincide con los reivindicados en la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención

La nomenclatura de las mutaciones y los polimorfismos viene definida en

- Antorankis S. E and the Nomenclature Working Group, Recommendations for a Nomenclature Systems for Human Gene Mutations. Human Mutation 11:1-3; 1998.
- Dunnen JT, Antorankis S.E. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to describe Complex Mutations: A Discussion. Human Mutation 15:7-12, 2000.

Asimismo el concepto del polimorfismos se define en

- Harris H. The Principles of Human Biochemical Genetics 3rd Edition. Amsterdam. North-Holland 1980.
- Beauder AL, Scriver CL, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, En The Metabolic and Molecular Bases of

Inherited Disease. Editores Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D 7th Edition.
pg. 53 MacGraw Hill. New York 1995.

Se han detectado, aislado y caracterizado toda una serie de mutaciones nuevas que se detallan a continuación. Asimismo, toda una serie de mutaciones y polimorfismos ya descritos, se han combinado con aquéllas para analizar la probabilidad de que un individuo desarrolle hipercolesterolemia familiar. Todas las mutaciones y polimorfismos que en esta invención se relacionan con el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar, se producen en la secuencia génica SEQ ID NO:1 correspondiente al gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL). Es decir, todas las mutaciones se producen en el mismo gen, se emplean en el mismo dispositivo de ensayo, utilizándose la misma tecnología, para determinar, según un mismo método, extracorpóreamente e in vitro, la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad, lo que apoya el carácter unitario de la invención.

En la Tabla I se detallan todas las mutaciones nuevas detectadas, según la nomenclatura científicamente aprobada y detallada en las publicaciones mencionadas anteriormente. Asimismo se les otorga un código alfa-numérico.

En la Tabla II se detallan mutaciones ya descritas y conocidas, cuyo uso en combinación con las mutaciones de la Tabla I, en dispositivos de ensayo in vitro para diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar es una de las formas preferidas, nueva e inventiva, de realización de la invención. Asimismo, de forma análoga a lo mencionado para las mutaciones conocidas, en la Tabla III se detallan polimorfismos.

Las mutaciones de amino ácidos se representan en códigos de una letra que tienen su equivalencia según la Tabla IV.

TABLA I

	MUTACION	CÓDIGO
5	(-23)A>C	M002
	1054 del11	M006
	108delC	M008
	1197del9	M009
10	1207delT	M010
	1432delG	M012
	191-2delAinsCT	M016
	2184delG	M020
	231delC	M022
15	2399del5/ins4	M024
	313+1insT	M027
	338del16	M029
	509insC	M030
	675del15	M032
20	684dup12	M034
	941-39C>T	M041
	C127R	M045
	C195R	M046
	C255G	M0100
25	C319Y	M050
	D157G	M059
	D630N	M063
	E291X	M068
	H635N	M096
30	N59K	M074
	T41M	M097
	W515X	M098
	Y379X	M092
	Y421X	M093
35		
40		



TABLA II

	MUTACIÓN	CÓDIGO	MUTACIÓN	CODIGO
	2393del 9	M001	G571E	M072
5	(-42)C>G	M003	N543H	M073
	(-49)C>T	M004	N804K	M075
	1045delC	M005	Q12X	M076
	1061-8T>C	M007	Q133X	M077
	A378T	M0102	Q357P	M078
10	C358R	M0104	Q427X	M079
	1358+1G>A	M011	Q71E	M080
	1706-10G>A	M014	R395Q	M081
	1845+1G>C	M015	R574W	M082
	2085del19	M017	R612C	M083
15	211del G	M018	S156L	M084
	2140+5G>A	M019	S205P	M085
	2207insT	M021	T413K	M086
	2390-1G>C	M023	T705I	M087
	313+1G>C	M025	V502M	M089
20	313+1G>A	M026	W(-18)X	M090
	313+2insT	M028	W541X	M091
	518 del G	M031	D679E	M094
	7delC	M035	1359-1G>A	M099
	872delC	M036		
25	884delT	M038		
	920ins4	M039		
	A519T	M042		
	C113W	M043		
	C255X	M047		
30	C281Y	M048		
	C297F	M049		
	C347Y	M051		
	C371X	M052		
	C646Y	M053		
35	C677Y	M054		
	C68W	M055		
	C74G	M056		
	C95R	M057		
	D151N	M058		
40	D200G	M060		
	D200Y	M061		
	D280G	M062		
	E10X	M064		
	E246A	M066		
45	E256K	M067		
	F634L	M069		
	G322S	M070		
	G352D	M071		

TABLA III

	POLIMORFISMOS	CÓDIGO
5	81T>C BstUI Exón 2	P1
	1060+10G>C SmaI Exón 7	P2
	1171G>A StuI Exón 8	P3
	1413G>A DdeI Exón 10	P4
10	1617C>T BstNI Exón 11	P5
	1725C>T SSCP Exón 12	P6
	1771C>T HincII Exón 12	P7
	1959 T>C AvaII Exón 13	P8
15	2232G>A MspI Exón 15	P9

TABLA IV

	<u>CÓDIGOS AMINOÁCIDOS</u>		
20	Alanina	Ala	A
	Aspártico	Asp	D
	Glutámico	Glu	E
	Glicina	Gly	G
25	Fenilalanina	Phe	F
	Leucina	Leu	L
	Serina	Ser	S
	Tirosina	Tyr	Y
	Cisteina	Cys	C
30	Triptófano	Trp	W
	Leucina	Leu	L
	Prolina	Pro	P
	Histidina	His	H
	Glutamina	Gln	Q
35	Arginina	Arg	R
	Isoleucina	Ile	I
	Metionina	Met	M
	Treonina	Thr	T
	Asparagina	Asn	N
40	Lisina	Lys	K
	Serina	Ser	S
	Arginina	Arg	R
	Valina	Val	V
45	Terminación	Ter	X

El dispositivo de ensayo (biochip) desarrollado en la invención consta de un soporte que presenta en su superficie toda una serie de sondas que se recogen en el listado de secuencias. Estas sondas oligonucleotídicas son capaces de hibridar con las secuencias mutadas contenidas en las Tablas I a III. La sistemática a utilizar sería la siguiente, para
5 cada una de las mutaciones.

Impresión de los portas de vidrio

- Se imprimen los oligonucleótidos capaces de detectar la mutación en un porta de vidrio aminosilanado empleando DMSO como tampón de impresión.
- 10 • La impresión se lleva a cabo con un "spotter" o impresor de oligonucleótidos en el que se controlan la temperatura y la humedad.

Procesamiento de los portaobjetos de vidrio

- Tras la impresión se somete a un tratamiento con radiación ultravioleta.

15

Preparación de la muestra a hibridar

- Se extrae el ADN del paciente a partir de una muestra de sangre de aproximadamente 300 µl mediante un protocolo de filtración.
- Se amplifican para dicho paciente todos los exones y el promotor del gen del receptor LDL, a través de PCR multiplex.
- 20 • En la misma reacción de amplificación se incorpora un nucleótido unido a biotina constituyendo un marcaje indirecto que requiere un revelado final con un complejo fluoróforo-estreptavidina.
- Se comprueba en gel de agarosa que ha tenido lugar reacción de amplificación.
- 25 • Se somete a fragmentación la muestra a hibridar.
- Se añade el tampón de hibridación.
- Se procede a la desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C.

Hibridación

- La hibridación se lleva a cabo automáticamente en la estación desarrollada para tal fin por Amersham Biosciences.

- Se prehibrida el portaobjetos.

5 • Se inyecta con una pipeta Hamilton la solución a hibridar.

- Se hibrida durante 1 hora.

- Se lava 3 veces con tampón de lavado.

- La estación procede al secado del soporte de vidrio.

10 **Escaneado del portaobjetos**

- Se introduce el portaobjetos en el escáner.

- Se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

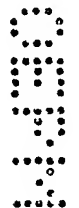
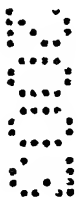


15 **Cuantificación de la imagen**

- El software del escáner nos permite cuantificar en la imagen obtenida la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.

- A partir de la señal que se obtiene en los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado establecemos la presencia o ausencia de la mutación en el paciente.

20 Cada mutación presenta en el portaobjetos cuatro oligonucleótidos repetidos 10 veces para su detección. Dos de ellos detectan el alelo normal y otros dos el mutado. La base interrogada se encuentra siempre en posición central.



25 En el caso de un paciente normal (Fig. 3A), no presenta alelo mutado. Por consiguiente en la imagen que se obtiene del soporte de vidrio los oligonucleótidos que detectan dicho alelo no presentan señal de hibridación o una señal menor que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal.

 Por el contrario, un individuo heterocigoto (Fig. 3B) para la mutación presenta el alelo normal y el mutado. De ahí que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado presentan una señal de hibridación equivalente.

30 Los resultados de la hibridación del ADN-chip con PCRs marcados, producidos a partir del ADN de los individuos a analizar, demuestran que el individuo representado en la Figura 3A no tiene una mutación puntual en el gen rLDL que ocasiona un cambio de

aminoácido E256K, y que el individuo de la Figura 3B es heterocigoto para esa mutación. De esta forma el individuo heterocigoto quedaría diagnosticado genéticamente como hipercolesterolémico familiar.

5 A continuación se detallan mediante ejemplos el análisis de algunas de las mutaciones detectadas con el dispositivo de ensayo de la invención.

EJEMPLO 1: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 1 del gen del r-LDL.

10 Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 1 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex1F (SEQ ID NO: 2) y Ex1R (SEQ ID NO: 3).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq
15 ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 74°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de
20 conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

25

Análisis de la mutación (-23)A>C

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Ava II. Cinco microlitros del material amplificado del exón 1 se hidrolizaron con 15 unidades de Ava II en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el
30 fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 148 y 67 pb para el alelo normal y de 93, 55 y 67 para el alelo mutado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se

visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.

La mutación (-23)A>C se encontró en una mujer de 60 años que presentaba arco corneal y xantelasmas, habiendo sido diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 8 según los criterios de diagnóstico del MedPed (Familial hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). La historia familiar no reveló evidencia de enfermedad cardiovascular prematura en familiares de primer grado. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) 352 mg/dL, c-LDL 271 mg/dL, y sus triglicéridos (TG) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) estaban dentro del rango de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (20mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 251 y 171 mg/dL respectivamente.

15

EJEMPLO 2: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 2 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 183 pb del exón 2 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex2F (SEQ ID NO: 4) y Ex2R (SEQ ID NO: 5).

20

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

25

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una

30

mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 108delC

5 Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 1 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 150 y 33 pb para el alelo normal y de 118, 33 y 32 para el alelo mutado; estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44.

15 La mutación 108delC se encontró en una mujer de 50 años sin ninguna sintomatología clínica, fue diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 9 puntos según los criterios de diagnóstico del MedPed. La historia familiar mostró que un familiar en primer grado había tenido enfermedad cardiovascular prematura. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 381 mg/dL, c-LDL 321 mg/dL, TG 142 mg/dL y c-HDL 32 mg/dL.

20

Análisis de la mutación T41M

25 Esta mutación (185C>T, ACG>ATG, Thr41Met) destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción TaiI. Quince microlitros del material amplificado del exón 2 se hidrolizaron con 15 unidades de TaiI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 154 y 29 pb para el alelo normal y de 183 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 y SEQ ID NO: 148.

30

La mutación T41M se detectó en un hombre de 69 años que había tenido un infarto de miocardio a la edad de 55 años, y que había sido diagnosticado clínicamente de hipercolesterolemia familiar: 6 puntos según los criterios de diagnóstico del MedPed. El paciente tenía historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 274 mg/dL, c-LDL 217 mg/dL y sus triglicéridos (TG) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) estaban dentro del rango de la normalidad.

10 **EJEMPLO 3: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 3 del gen del LDL.**

Se amplificó un fragmento de 196 pb del exón 3 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO: 7).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 15 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 20 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia 25 de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 191-2delAinsCT

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BfaI en presencia del alelo normal y que desaparece en presencia del alelo mutado.

Se amplificó un fragmento de 184 pb del exón 3 por la técnica de PCR utilizando los desoxioligonucleótidos Ex3R (SEQ ID NO: 7) y Mut191-2F (SEQ ID NO: 8).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 161 y 23 pb para el alelo normal y de 185 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado, estos fragmentos, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48.

La mutación 191-2delAinsCT se encontró en dos familias aparentemente no relacionadas con hipercolesterolemia familiar de herencia autosómica dominante. El probando de una familia era una mujer de 58 años con xantomas tendinosos, xantelasmas y angina de pecho y con historia familiar de enfermedad coronaria e hipercolesterolemia. Fue diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 15 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 559 mg/dL, c-LDL 467 mg/dL, TG 175 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL El tratamiento hipolipemiante con

simvastatina (40mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 302 y 228 mg/dL respectivamente.

Análisis de la mutación N59K

5 Esta mutación (240C>A, AAC>AAA, Asn59Lys) destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 111 y
10 85 pb para el alelo normal y de 196 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO:
15 50, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52.

La mutación se detectó en un hombre de 43 años diagnosticado clínicamente de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 12 según criterios del MedPed. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio de tratamiento farmacológico fueron: CT 465 mg/dL, c-LDL 397 mg/dL, TG 100 mg/dL y c-HDL 48 mg/dL. El
20 tratamiento hipolipemiente con simvastatina (40mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 350 y 282 mg/dL respectivamente. Su madre había sufrido un infarto de miocardio a la edad de 58 años y el probando tenía un hijo de 8 años con hipercolesterolemia (CT 325 mg/dL y c-LDL 241 mg/d).

Análisis de la mutación 231delC

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HaeIII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de HaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían
30 un tamaño de 76, 51, 41 y 25 pb para el alelo normal y de 117, 51 y 27 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56.

5 La mutación se detectó en una mujer de 37 años que presentaba arco corneal y que había sido diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación 16 puntos según criterios del programa de la OMS, MedPed. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 543 mg/dL, c-LDL 456 mg/dL, TG 178 mg/dL y c-HDL 51 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente combinado con atorvastatina (40 mg/día) y colestipol (20 g/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 260 y 190 mg/dL respectivamente. Un hermano había tenido infarto de miocardio a la edad de 38 años, y uno de sus hijos de 12 años era hipercolesterolémico con una concentración de CT de 305 mg/dL.

Análisis de la mutación 313+1insT

15 Esta mutación crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción TruII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de TruII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de esta hidrólisis tenían un tamaño de 196 pb para el alelo normal y de 162 y 34 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60.

25 La mutación 313+1insT se detectó en una mujer de 53 años con xantomas tendinosos y arco corneal. No se observó historia familiar de enfermedad coronaria prematura en sus familiares en primer grado. Según los criterios clínicos de hipercolesterolemia del MedPed esta mujer tenía una puntuación de 19. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 574 mg/dL, c-LDL 505 mg/dL y con TG y c-HDL estaban dentro del rango de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente combinado con simvastatina (80 mg/día) y colestipol (20 g/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 286 y 225 mg/dL, respectivamente.

EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4A del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 242 pb de la zona 5' del exón 4 (4A) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos:

5 Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y Ex4AR (SEQ ID NO: 10).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

10 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

20 **Análisis de la mutación 338del16**

Esta mutación crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Van91I. Quince microlitros del material amplificado del exón 4A se hidrolizaron con 15 unidades de Van1I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 242 pb para el alelo normal y de 194 y 52 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151 y SEQ ID NO: 152.

La mutación 338del16 se encontró en tres familias no relacionadas con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de estas familias era un

varón de 40 años con xantomas tendinosos y arco corneal, CT 542 mg/dL y c-LDL de 441 mg/dL, con TG y c-HDL normales. La puntuación para el diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar según el MedPed fue de 19 puntos. No se observó que hubiese historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (10 mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 293 y 218 mg/dL, respectivamente.

Análisis de la mutación C127R

Esta mutación (442T>C, TGT>CGT, Cys127Arg) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BseDI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4A se hidrolizaron con 15 unidades de BseDI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tras la digestión fueron de 201 y 41 pb para el alelo normal y de 112, 89 y 41 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

La mutación C127R se encontró en una mujer de 51 años con CT de 438 mg/dL, c-LDL de 372 mg/dL y con TG y c-HDL normales. Esta mujer presentaba xantomas tendinosos y arco corneal. Fue diagnosticada clínicamente de hipercolesterolemia familiar con una puntuación total según criterios del Med Ped de 15. La probando tenía dos hermanos y un hijo con hipercolesterolemia. No se observó presencia de enfermedad coronaria prematura en sus familiares en primer grado.

Análisis de la mutación 509insC

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con tres bases desapareadas, una de las cuales crea un sitio de reconocimiento par la enzima de restricción MnlI en presencia del alelo mutado pero no desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 244 pb del exón 4A por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y el desoxioligonucleótido Mut509insCR (SEQ ID NO: 11).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con
5 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq
ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:
10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C
durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2
10 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de
MnII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante
(Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un
tamaño de 141, 99 y 4 pb para el alelo normal y de 141, 88, 12 y 4 pb para el alelo
15 mutado. estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%
y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito
("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO:
66, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68.

20 La mutación 509insC se encontró en una mujer de 44 años con
hipercolesterolemia CT 477 mg/dL y c-LDL 394 mg/dL con TG y c-HDL normales, sin
historia familiar ni personal de enfermedad coronaria. El diagnóstico clínico según
criterios del MedPed alcanzó una puntuación de 9. Dos de sus hermanos tenían
hipercolesterolemia con una concentración de c-LDL por encima del percentil 95.

25

EJEMPLO 5: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4 B del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 237 pb de la zona 3' del exón 4 (4B) por la técnica
de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos
30 Ex4BF (SEQ ID NO: 12) y Ex4BR (SEQ ID NO: 13).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con
500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM

MgCL₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D157G

Esta mutación (533A>G, GAT>GGT, Asp157Gly) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 237 pb correspondiente al material amplificado sin digerir para el alelo normal y de 175 y 62 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72.

La mutación D157G se encontró en una mujer de 32 años con hipercolesterolemia, sin historia familiar ni personal de enfermedad coronaria. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 358 mg/dL y c-LDL 296 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL de 57 y 61 mg/dL, respectivamente. El tratamiento con atorvastatina (10 mg/día) redujo su colesterol total a 212 mg/dL y su c-LDL a 140 mg/dL. Su familia paterna presentaba

historia de hipercolesterolemia: El padre con CT de 364 mg/dL, y la abuela y un tío paterno con CT de 341 mg/dL y 320 mg/dL, respectivamente.

Análisis de la mutación C195R

5 Esta mutación (646T>C, TGT>CGT, Cys195Arg) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 237 pb, correspondiente al material
10 amplificado sin digerir, para el alelo normal y de 159 y 78 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76.

15 La mutación C195R se detectó en una mujer de 64 años con arco corneal, con hipercolesterolemia e historia familiar de enfermedad coronaria prematura en su madre. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar fue clasificado de seguro con una puntuación según criterios del MedPed de 11. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 560 mg/dL y c-LDL 468 mg/dL con niveles de
20 TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación 675del15

Esta mutación se puede identificar por análisis de heteroduplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 4B cuando
25 existe mutación muestra la presencia de bandas de heteroduplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homoduplex de 237 y 222 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heteroduplex que se forman migran a velocidad mas lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente,
30 esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80.

La mutación 675del15 se detectó en una mujer de 63 años con hipercolesterolemia, sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos siendo clasificado de seguro. No se pudo conseguir la colaboración sus familiares para realizar el estudio lipídico y genético. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y c-LDL 379 mg/dL con niveles de TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación 684dup12

Esta mutación se analizó por digestión del fragmento amplificado del exón 4B con la endonucleasa de restricción MnlI. La adición de 12 pb adicionales que produce la mutación permite detectar la presencia de la mutación en el material amplificado del exon 4B por electroforesis en poliacrilamida al 8% y tinción del gel con bromuro de etidio. Adicionalmente, quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 192 y 45 pb para el alelo normal y de 204 y 45 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84.

La mutación 684dup12 se detectó en dos familias no relacionadas con hipercolesterolemia de herencia autosómica dominante. El probando de una de estas familias era un hombre de 63 años con xantomas tendinosos y arco corneal, que había sufrido un infarto de miocardio a la edad de 55 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 469 mg/dL y c-LDL 408 mg/dL, con niveles de TG de 100 mg/dL y c-HDL de 41 mg/dL.

EJEMPLO 6: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 6 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 179 pb del exón 6 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP): los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación C255G

Como esta mutación (826T>G, TGC>GGC, Cys255Gly) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BstUI en presencia del alelo mutado, que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 163 pb del exón 6 por la técnica de la PCR utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6R (SEQ ID NO: 15) y MutC255GF (SEQ ID NO: 16).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de BstUI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 163 pb para el alelo normal y de 141 y 22 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88.

La mutación C255G se encontró en una mujer de 63 años con historia familiar de hipercolesterolemia familiar. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 439 mg/dL y c-LDL 355 mg/dL con niveles de TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación E291X

Como esta mutación (934G>T, GAG>TAG, Asp291Stop) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción SspI en presencia del alelo mutado que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 164 pb del exón 6 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex6F (SEQ ID NO: 13) y el desoxioligonucleótido Mut E291XR (SEQ ID NO: 17).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de SspI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 164 pb (fragmento no digerido) para el alelo normal y de 144 y 20 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92.

La mutación E291X se encontró en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un varón de 44 años con arco corneal con concentraciones de CT de 381 mg/dL, c-LDL de 314, TG 111mg/dL y c-HDL 45 mg/dL. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 12 puntos. El tratamiento hipolipemiente combinado con simvastatina (40 mg/día) y colestiramina (12 g/día) redujo su colesterol plasmático a 253 mg/dL y su c-LDL a 188 mg/dL.

EJEMPLO 7: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 7 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 234 pb del exón 7 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex7F (SEQ ID NO: 18) y Ex7R (SEQ ID NO: 19).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 57°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ

2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

5 Análisis de la mutación 941-39C>T

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción ApaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de ApaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 186, 26 y 22 pb para el alelo normal y de 208 y 26 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96.

La mutación 941-39C>T se detectó en cuatro familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 61 años que había sufrido un infarto de miocardio y con historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 7 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 340 mg/dL, c-LDL 248 mg/dL con TG de 136 mg/dL y c-HDL 65 mg/dL. Tras el tratamiento con 20 mg/día de atorvastatina el CT se redujo a 223 mg/dL y el c-LDL a 144 mg/dL, sin cambios significativos en sus cifras de TG y c-HDL.

Análisis de la mutación C319Y

Esta mutación (1019G>A, TGC>TAC, Cys319Tyr) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción RsaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de RsaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 234 (fragmento sin digerir)

para el alelo normal y de 136 y 98 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100.

La mutación C319Y se detectó en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con xantomas tendinosos en tendón de Aquiles y en los tendones extensores de las manos y arco corneal y que tenía un hijo de 17 años con colesterol total plasmático de 384 mg/dL. Su padre había fallecido de muerte súbita a los 45 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 22 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 428 mg/dL, c-LDL 372 mg/dL, estando el nivel de TG dentro del rango de la normalidad.

15 Análisis de la mutación 1054del11

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 189 y 45 pb para el alelo normal y de 223 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 104.

La mutación 1054del11 se detectó en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con xantomas aquíleos tendinosos y con un familiar en primer grado con enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 480 mg/dL, c-LDL 416 mg/dL, TG en 95 mg/dL y c-HDL 36 mg/dL.

EJEMPLO 8: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 9 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 224 pb del exón 9 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex9F (SEQ ID NO: 20) y Ex9R (SEQ ID NO: 21).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

20

Análisis de la mutación 1197del9

Esta mutación se puede analizar por análisis de heteroduplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 9 en presencia de esta mutación muestra dos bandas heteroduplex de un aparente mayor tamaño molecular que las bandas homoduplex de 224 y 215 pb que pueden distinguirse en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heteroduplex que se forman migran a velocidad mas lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107 y SEQ ID NO: 108.

La mutación 1197del9 se encontró en ocho familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 45 años con xantomas tendinosos y que había tenido un angina de pecho a los 41 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 18 puntos Su padre sufrió un infarto de miocardio a los 36 años. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 525 mg/dL, c-LDL 443 mg/dL, TC 153 mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento con atorvastatina (20 mg/día) redujo su CT a 323 mg/dL

Análisis de la mutación Y379X

Esta mutación (1200C>A, TAC>TAA, Tyr379Stop) destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 87, 56, 34, 22, 18, 4, y 3 para el alelo normal y de 87, 56, 38, 22, 18 y 3 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%, de esta forma se pudo distinguir las bandas de 34 y 38 pb que diferencian ambos alelos por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 112.

La mutación Y379X se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de esta familia era un varón de 69 años. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 7 puntos. Su padre había fallecido de infarto de miocardio a los 50 años y tenía dos hijos con colesterol total plasmático por encima del percentil 95. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 381 mg/dL, c-LDL 306 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales. Tras el tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (20 mg/día) su CT plasmático descendió a 259 mg/dL.

Análisis de la mutación 1207delT

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 140, 46, 35 y 3 para el alelo normal y de 140, 48 y 35 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%, mediante tinción con bromuro de etidio se pudo distinguir las bandas de 46 y 48 pb que diferencian ambos alelos. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO. 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 116.

La mutación 1207delT se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 35 años. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedFed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 429 mg/dL, c-LDL 345 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 188 y 46 mg/dL respectivamente. El tratamiento hipolipemiente combinado con 40 mg/día de simvastatina y 5 g/día de colestipol redujo el CT a 220 mg/dL y el c-LDL a 137 mg/dL, sin cambios significativos en sus cifras de TG y c-HDL.

Análisis de la mutación Y421X

Esta mutación (1326C>G, TAC>TAG, Tyr421Stop) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BfaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 224 (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 164 y 60 para el alelo mutado: Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 120.

5 La mutación Y421 se encontró en tres familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 71 años con xantomas tendinosos, xantelasmas y arco corneal. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Su padre sufrió un infarto de miocardio a los 51 años y tenía un hijo con hipercolesterolemia acusada (CT 10 367 mg/dL). Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 615 mg/dL, c-LDL 550 mg/dL, con TC y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

EJEMPLO 9: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 10.

15 Se amplificó un fragmento de 278 pb del exón 10 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes desoxioligonucleótidos Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

25 Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de 30 restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 1432delG

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción NaeI en presencia del alelo mutado que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 200 pb del exón 10 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex10R (SEQ ID NO: 23) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut1432delGF (SEQ ID NO: 24).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de NaeI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 200pb (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 179 y 20pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123 y SEQ ID NO: 124.

La mutación 1432delG se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 53 años con xantomas tendinosos y que había sufrido un infarto de miocardio, presentando además historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 15 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 548 mg/dL, c-LDL 470 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

EJEMPLO 10: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 11 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 11 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación W515X

Esta mutación (1607G>A, TGG>TAG, Trp515Stop) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BfaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 164 y 30 pb para el alelo normal y de 97, 67 y 30pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127 y SEQ ID NO: 128.

La mutación W515X se encontró en un hombre de 39 años con arco corneal, cuyo padre con hipercolesterolemia había tenido un infarto de miocardio a los 50 años. Su

diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 364 mg/dL, c-LDL 308 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales. El padre del probando, dos hermanos y un hijo tenían cifras de colesterol por encima del percentil 95.

EJEMPLO 11: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 13 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 13 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex13F (SEQ ID NO: 27) y Ex13R (SEQ ID NO: 28).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D630N

Esta mutación (1951G>A, GAT>AAT, Asp630Asn) destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 89pb, 48pb, 39 pb, dos de 14 pb y 11 pb para el alelo normal y de 89pb, 59pb, 39pb, dos de 14 pb y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida

al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 132.

5 La mutación D630N se encontró en dos familias no relacionadas con hipercolesterolemia familiar de herencia autosómica dominante. El probando era una mujer de 36 años cuyos padres habían fallecido ambos de infarto de miocardio a los 62 y 64 años.

10 El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 7 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 332 mg/dL, c-LDL 268 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 81 y 48 mg/dL, respectivamente.

Análisis de la mutación H635N

15 Como esta mutación (1966C>A, CAC>AAC, His635A_{sn}) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con dos bases desapareadas que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *CaiI* en presencia del alelo normal y que desaparece en presencia del alelo mutado.

20 Se amplificó un fragmento de 169 pb del exón 13 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex13F (SEQ ID NO: 27) y el desoxioligonucleótido con dos bases desapareadas MutH635NR (SEQ ID NO: 29).

25 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

30 Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de *CaiI* en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 151 y 18 pb para el alelo normal y de 169 pb para el alelo mutado, estos

fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamia al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135 y SEQ ID NO: 136.

La mutación H635N se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con arco corneal y sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura. La madre y tres de sus hermanos presentaron concentraciones de colesterol por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 448 mg/dL, c-LDL 384 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

EJEMPLO 12: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 15 del gen del r-LDL

Se amplificó un fragmento de 243 pb del exón 15 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex15F (SEQ ID NO: 33) y Ex15R (SEQ ID NO: 34).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 90 segundos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 2184delG

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción AluI. Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de AluI en un volumen final de 30 µl, según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos resultantes tenían un tamaño de 166 y 78 pb para el alelo normal y de 166, 67 y 11 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamia al 8%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 140.

La mutación 2184delG se detectó en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 32 años con historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 330 mg/dL, c-LDL 270 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

EJEMPLO 13: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 17 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 242 pb del exón 17 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex17F (SEQ ID NO: 35) y Ex17R (SEQ ID NO: 36).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 300 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,

200 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada desoxiligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante dos minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 2399del5ins4

Esta mutación elimina la secuencia TCTTC e inserta la secuencia GGGT en la posición 2399 creando un nuevo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Ava*I. Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de *Ava*I en un volumen final de 30 μ l según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes tenían un tamaño de 230 y 12 pb para el alelo normal y de 183, 46 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 y SEQ ID NO: 144.

La mutación 2399del5ins4 se detectó en tres familias no relacionadas con hipercolesterolemia de herencia autosómica dominante. El probando de una familia era una mujer de 49 años con xantomas tendinosos y cuyo padre había fallecido a los 51 años de infarto de miocardio. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 510 mg/dL, c-LDL 424 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 140 y 58 mg/dL respectivamente. El tratamiento farmacológico combinado con simvastatina 20 mg/dL y colestipol 20 g/día

redujo su colesterol total plasmático a 280 mg/dL. Por otra parte, dos hijos suyos de 22 y 20 años tenían cifras de colesterol de 330 y 386 mg/dL, respectivamente.

Descripción de las figuras:

- 5 **Figura 1:** Esta figura es una representación esquemática de la ruta celular que sigue el r-LDL. El r-LDL se sintetiza en el retículo endoplásmico como una proteína precursora de 120 Kilodaltons y es transportado al aparato de Golgi. Una vez que es transferido a la superficie celular el receptor reconoce a la apolipoproteína B que es el componente
- 10 liposomal por el proceso denominado endocitosis. Esta captación permite satisfacer las necesidades de colesterol de la célula e induce a la supresión de la síntesis endógena de colesterol.
- Figura 2:** La figura representa los cinco dominios estructurales de la proteína del receptor LDL humana y su correspondencia con los exones del gen.
- 15 **Figura 3:** Portaobjetos de cuantificación de imagen con 4 cebadores (2 normales y 2 mutados) repetidos en 10 pocillos para mutación E 256K. (A) individuo normal (B) individuo con hipercolesterolemia familiar.



REIVINDICACIONES

1.- Secuencia génica correspondiente a SEQ ID NO:1 que comprende al menos una de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054 del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT, 2184delG; 231delC, 2399del5ins4, 313+1insT, 338del16, 509insC, 675del15, 684dup12, 941-39C>T, C127R, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

2.- Secuencia génica según la reivindicación 1 que comprende además, alguna de las siguientes mutaciones: 2393del 9, (-42)C>G, (-49)C>T, 1045delC, 1061-8 T>C, A378T, C358R, 1358+1G>A, 1706-10 G>A, 1845+1G>C, 2085del19, 211del G, 2140+5G>A, 2207insT, 2390-1G/C, 313+1G>C, 313+1G/A, 313+2insT, 518 del G, 7delC, 872delC, 884delT, 920ins4, A519T, C113W, C255X, C281Y, C297F, C347Y, C371X, C646Y, C677Y, C68W, C74G, C95R, D151N, D200G, D200Y, D280G, E10X, E246A, E256K, F634L, G322S, G352D, G571E, N543H, N804K, Q12X, Q133X, Q357P, Q427X, Q71E, R395Q, R574W, R612C, S156L, S205P, T413K, T705I, V502M, W(-18)X, W541X, D679E, 1359-1G>A, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

3.- Secuencia génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende, además, alguno de los siguientes polimorfismos: 81T>C BstUI Exón 2, 1060+10G>C SmaI Exón 7, 1171G>A StuI Exón 8, 1413G>A DdeI Exón 10, 1617C>T BstNI Exón 11, 1725C>T SSCP Exón 12, 1771C>T HincII Exón 12, 1959 T>C AvaII Exón 13, 2232G>A MspI Exón 15, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

4.- Uso de la secuencia génica de la reivindicación 1 en el diseño y la preparación de sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con alguna de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054 del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT, 2184delG, 231delC, 2399del5/ins4, 313+1insT, 338del16, 509insC, 675del15, 684dup12, 941-39 C>T, C127R, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X.

5.- Sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con cualquiera de las mutaciones comprendidas en la secuencia génica de la reivindicación 1.

6.- Sondas oligonucleotídicas según la reivindicación 5 seleccionadas entre al menos unas de las siguientes SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152.

7.- Uso de las sondas de la reivindicación 5 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

8.- Uso de las sondas de la reivindicación 6 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.

5 9.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de la reivindicación 5, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

10.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de las reivindicación 6, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

10 11.- Uso de algunas de las sondas seleccionadas entre: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

20 12.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 que comprende un soporte al que se acoplan además alguna de las sondas seleccionadas entre: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

25 13.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1.

30 14.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las

mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguna de las mutaciones de dicha SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 2.

5 15.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguno de los polimorfismos de dicha SEQ ID NO:1, descritos en la reivindicación 3.

10 16.- Método de diagnóstico según las reivindicaciones 13 a 15 que comprende amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólo o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxioligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 152 o combinaciones de los mismos, sometiendo los productos PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP
15 para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9, 10 ó 12.



Figura 1

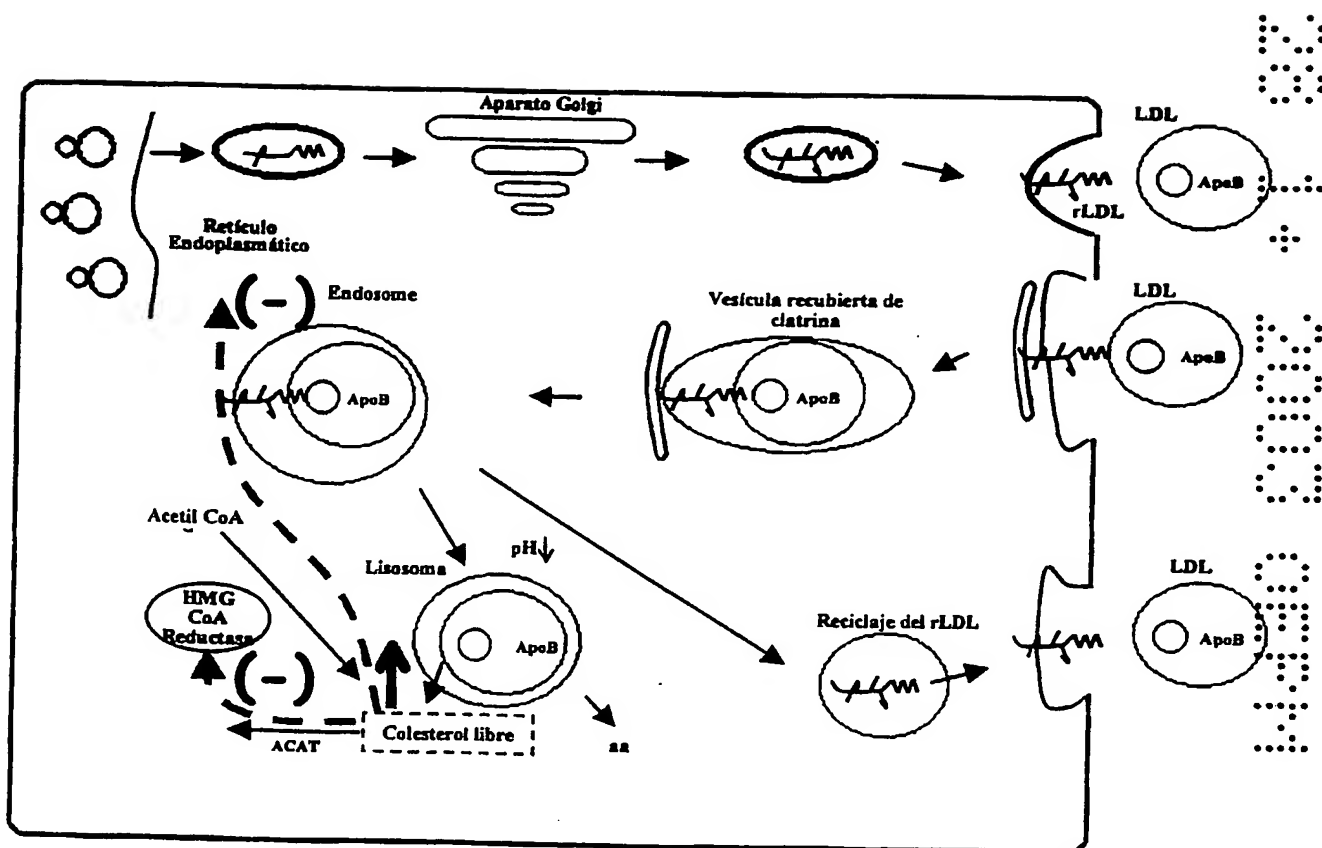
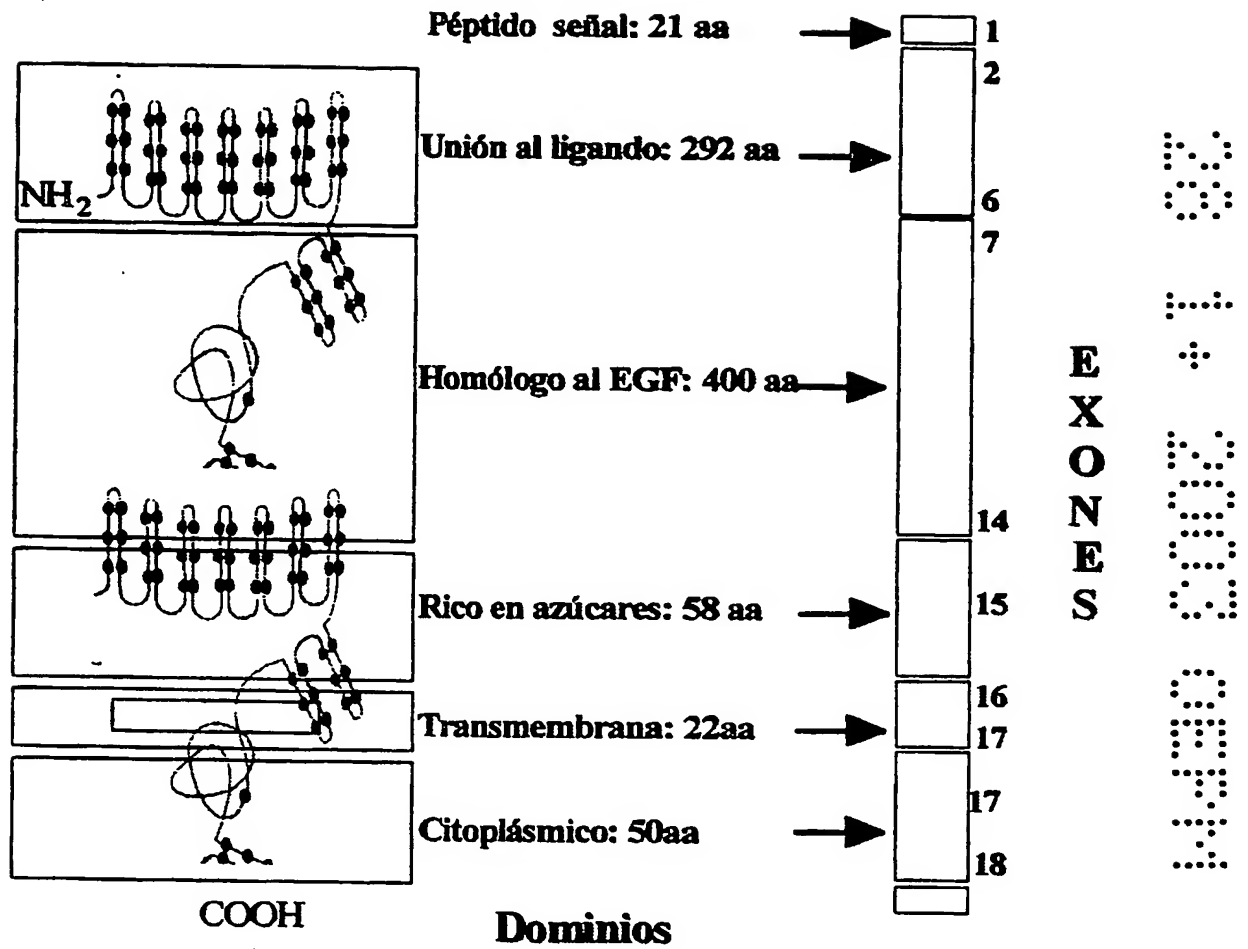
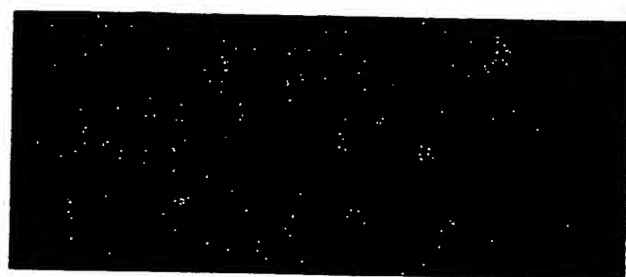


Figura 2





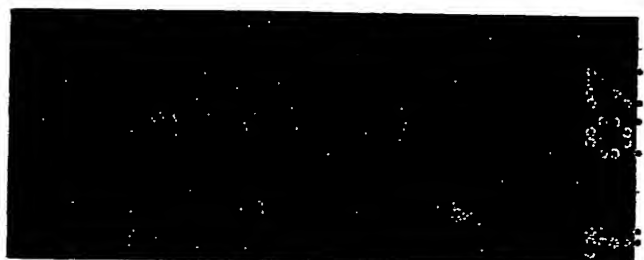
A

MUTADO 2

NORMAL 2

MUTADO 1

NORMAL 1



B

Figura 3



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EFARMES, S.A.

<120> "PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GENICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR".

<130> P-99916

<160> 152

<210> SEQ ID NO.: 1

<211> 60.000

<212> polinucleótido

<213> humano

<220>

<221> gen

<223> rLDL

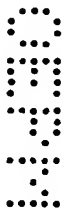
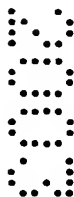
<400>

aaaagatggt gtatccattc aatggaacat tatttggcct ttaaaaggaa ggaaattctc 60
actgagcata gtggtttatg cctgtaatcc cagcactttg ggaggctgag gcagggggga 120
gggggcggtt cacctgaggt caggagttca agaccagcct ggccaacatg gtgaaatccc 180
gtctctacta aaaatacaaa aaaattagcc gagtgtggtg gcacacacct gtaagccagg 240
ctacacggga gactgaggca ggagaatcgc tggaaaccgg gaggcagagg ctgcagagag 300
ccgagattgc gtcactgcac tccagcctgg gtgacagagc gagactcttg tcttaaaaaa 360
aaaaagaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aagttctgac acaggctcca acacagatgt 420
tatgctcagt gaaataagcc agacatgaaa ggacaaatac tgctgatct cattcataag 480
aggtccttag aattgtagaa tgggtgtgtgc cacgggctgg gagggggtgt ggccagagtt 540
tcagtttggt aagttgagaa tgttctggag atggatggcg gtagtggtgg ttgcacaact 600
gtgtgaatgc gcttaatgcc tctgaattgt gcagttacaa gtggttcgga tgggccgggc 660
gcggtggctc atgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcagggt gatcatgaga 720
tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc catctctact aaaaaataca 780
aaaaattagc caggcatggt ggtgggcacc tgtagtccca gctacttggg aggcggaggc 840
aggagaatgg cgtgaacacg ggaggcagaa cttgcagtga gccgagatca cgccactgca 900
ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctaaaaaaa aaaaagtggg taagatgggc 960
cgggcatggg ggatcacgct tgcaatccca acactttggg aggctgaggt gggtgattac 1020
gaggtcagga gttcgagacc agcctgacca ccatggtgaa accccgtctc tactaaaagt 1080

acaaaattag ccgggtgtcg tggcacacgt ctgtaatccc agctactggg gaggctgagt 1140
 tgggaggatc acctgagccc agggaggtcc aggctgcagc aagccatgat tgcaccactg 1200
 cactccagcc tgggtgagag agtgagaccc tgtctccaaa caaacacaca tgaaaaacag 1260
 attttttttg ccaggtgcag tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg gaggccaaagg 1320
 cgggtggatc acgaggtcag gtgactgaga gcatcctggc taacacgggtg aaaccttggc 1380
 tctactaaaa atacaaaaat ttagccgagc atggtggtgg gcacctgtag tcccagctac 1440
 tcgggagggt gaggcaggag aatggcatga acctgggagg cggagcttgc agtgagctga 1500
 gatcacgcca ctgcaactta gcctggggga cacagcaaaa ctgtctcaaa aaaaaaaaaa 1560
 aaggtttttt taattttaaaa aggaaagaaa aggagagtgc tcgtgtggca ggcacctagc 1620
 cctgtccagc gcaccttgag acagggatga tgtctcctcc ttgacctaa accacaagtt 1680
 ctaaccaatt caaccgagga cagagcccca attccaggca gggcaatggg gtcgccttgt 1740
 gaactaagat gcagatggag aagagcagac acagacacag gtcttggggc ccctgcaggg 1800
 gtttctcact ggctttttcc ccctggattc ctatgggttc tggggaacag agttaggtcg 1860
 gctggcaaga cagatgcatg aggctgtggc gcccttgaca ttgagccgga gggccagagt 1920
 tcgtcattgc tgacgcagag aagctgggag ccaagggttag ccagatgggt tggaggagtt 1980
 ttaaacaatc ttttcttttc tttctctttc catctgtctg tccttctttc ctcccttctt 2040
 gccccctttc ttttctcctt tctttccttc ctctctcctt cctccctttt tttctttttt 2100
 tttggttttc tttttgtatt agtattatta ttttttagac agggctcttg tctgttgccc 2160
 aggctggagg gcagtgccac gatcacagct cagtacaccc tcaaccttct gggttcaagc 2220
 aatcctcctg ccttggcctc ccaggtagct gggactacag gcgtgtgcca ccacacctgg 2280
 ttaatttttt ttttttttga gacggagtct tgctctgtca cccaggctgc agtgacgtgg 2340
 cgtgatctcg gctcactgca acctccacct cccgggttca agcgatcctc ctgcctcagc 2400
 ctcccagta gctgggatta cagcgccccg ccaccaagcc cggctaattt ttttattttt 2460
 agtagagaca gagtttcacc acgttggcca ggctcgtctc aaactcctga cttagtgatc 2520
 taccacacct ggctctcaa agtgctggga ttagaggcgt gagccaccat gcgcagccaa 2580
 tttttgtatt ttagtagag atgggggttc accatgttgg tcagtctggc ctggaactcc 2640
 tgacctcaag tgatccacct gcctcagcct cccaaagtgc tgggaattaca ggcagtgacc 2700
 accgcgcca gccctcttaa ccatttttaa gtgcacagtt cagcagcatt aagcacattc 2760
 acattgttgt gcaaccatca gccccgctc atctccagct ttctcttttt tttgttttgt 2820
 tttgagacag ggtcttactc tctcgcccag tatagagtgc agtgggtgcg tcttggtctg 2880
 ctgcaacctc tgcttccag gttcaagcta ttctcctgcc tcagtctccc cagtagctgg 2940
 gattacagac acacatcacc acgcctgct aattattttg catttttagt agagatgggt 3000
 tttcaccata ttggccaggc tgatcttgaa ctctggcct caagtggctc gtcctaaact 3060
 gctgagatta cagccgtgag ccactgctcc cagccatctg cacttttctc atcttcccaa 3120
 atgtaactat gtccccgtga aacactcact cccattcca cctcccagc cctggcacc 3180
 cccattttta ttctggtgct aggggaattt caaaccaggc aagtctcaac acatgctcga 3240
 gtgtaagaac cagcccacag cctcggtccc taatcacggc caaaccagaa ttctactcca 3300
 ggttctactc tgtgaatctg ctttctgtga atctgttact ctggggaccg cctataagtt 3360
 gaatcctaca gtgtctccac ttcagtgaact ggettatctc acttttctcc tctttattta 3420
 tgagacaaaa ttctgctctt gttgctcagg ctggaatgca atggcgtgat ctgggctaata 3480
 ttttttgtat ttttagtaga ggcgggggtt caccatgttg gccaggctgg tctcgaactc 3540
 ctgaacctag acgatccact ttggccttcc aaagtgtggt gattacaggc gcggcccacc 3600



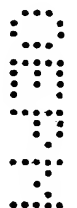
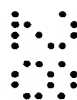
tttctcctct taatcacaca ggtaatccat acatacgaca ttcttttttt tttttgacac 3660
 ggagtcttac tctgtcacct aggctggagt gcagtggcgc aatcttggct cactgcaacc 3720
 tctgcctccc aggatcaagc aattctcctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag 3780
 gtaaccatca ccacacctgg ctaaattttg tatttttagt agagacgggg tttcaccacg 3840
 ttggccacgc tggattgaa ctctggctt caagtgatct tctgtctcg gtctcccgaa 3900
 gtgctgggat tacaggaatg agccactgtg cccggccaat acgacatctg tgcaatgaag 3960
 tgcaacatat aagacaccct tccccaccc actgccccca ccaccgcccc caccgccccca 4020
 cccccatctc cagatcagaa cctggggctg tgcaatttta aacgttgtag ccacttgcta 4080
 cttgggtagt tgaagttcag tctcagccag gttggagtc tggactctgg cccctctttt 4140
 atttttattt tttatttttt tttagacag agtctcgtc tgtcgcccag actggagcgc 4200
 agtgggtgca tctcggtca ctgcaagctc tgctcctga gttcacgcca tcccccgcc 4260
 tcagcctccc gagcagctgg gactacaggc gccgcgccacc acaccgggt aatttcttgt 4320
 atttttttagt agagatgggg tttcaccctg ttagccagga tggctagat ttctgacct 4380
 tatgatccgc ctgcctcggg cctcccaaag tgctgggatg acaggagtga gccaccgcgc 4440
 ccggcctctt ttttttttt tagacagtct ctgtcaccca ggctagagtg cgatgggtgcg 4500
 atctcggtc actgcaacct ccaccttccg ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc 4560
 tgagtatctg ggattacagg tgctgtgac cagcccggc tgatttttgt atttttagta 4620
 gagacgggg ttcaccacat tggtcaggct agcctcaaac tctgacccc gtgatccttc 4680
 cgcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggactctgg cccatcttgg ctgctgcaa 4740
 tgctccttct tctatcttgg tttttccaca gttacgcaca tggcagataa cggcgagtct 4800
 gttccccagc aactgcaacg gatctgcca ccactgggaa atggaagacc ttgcagccca 4860
 ggtctttgta gaccaagatt agattgtgg caacaaacac ctgaccttgg cttttggaac 4920
 catcagccat gtcagctaaa ataaaagcag aatctggctg ggcgcagtg ctcacgcctg 4980
 taatcccagc actttggggg gctgagggtg gcagaccacc tggaggtccg cgttctagac 5040
 cagcctgacc aatatgatga aaccccgct ctactaaaca taaaaaatt agctgggcat 5100
 ggtggcgggc acctgtaac ccagctactc gggaggctga ggaaggagaa ttgcttgaac 5160
 cctggaggca gaggttgtag tgagccgaga ttgcgccact gcactccaac ctggactgca 5220
 gaacaagact ctgtcccaa agcagataaa taaaaataaa taaaaataaa aatatggccg 5280
 ggcattgtgg ctcacacctg taatcccaac actgggaaga tggggcgggc agatcacgag 5340
 gtcagggatt cgagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc cgtctctac taaaaataca 5400
 aaaattagcc gggcatgatg ctgcatgcct gtaatccag ctactctgga ggctgaggca 5460
 ggagaatcgc ttcatcccgg gaggtggagc ttgcagttag ctgagatcgc gccactgcac 5520
 tctagcctgg gcaaaagagt gagactccat cgcaagaaaa aaaaaaaaaa aagctgcaag 5580
 ctctgtctcc cgggttcaag tgattctct gctcagcct tccaagtagc taggattata 5640
 cgcgcccgc accatgcctg gctaattttt gtatttttag tagagatgcg gtttcacat 5700
 gttggccagg ctggtctcaa actcctgacc tcacgtgatc cacctgcctc ggctcccag 5760
 agtgcctggg ttacaggtgt gaacccctgc gcctggccaa gaaaagttgc ttgaatgaag 5820
 agtaaataga agaccagaa agaaatgatt cgtccgagga aggtcacaga agcaacgtaa 5880
 tcaagatgga aatctgactc ttctaattt tggccagact tcccatccct ccaaagcttt 5940
 ccagactctt ccagatcatt ctatatttt ccagaaatca ttcgtgaaat ctaactagga 6000
 gtagtctgta aacaatgtgt ttcacacaga tacaattcat aaacgatgag aagacaagga 6060
 cacttcatga atgaaatttt tacggccggg tatgttggct cagcctata atcccaggac 6120



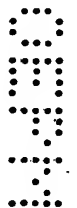
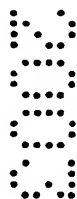
tttgaagac ccaggcagga ggattgcttg agtccaggag ttcaagacca gtctgggcca 6180
catagtgaga ccctgtcgct acaaaaaaatt taaaaattag gtagatatgg tgggtgatgc 6240
ctctagtttt agcttttttg gaggtggaag caggaggatc tcttgagccc aggaggttga 6300
gctgcaatga gctacgattg aactactaca ctccagtctg ggtgacagag aaagaggctg 6360
cctcaaaaaa ataaaaataa aaaaataagg ccggacgcgg tggctcacgc ctgtaatccc 6420
agcacttttg gaggtgaggg tgggcagacc acgagggtcag gagatcgagg ccatcctggc 6480
caacatgatg aaaccctgtc tctactgaaa acacaaaaat tagctgggcg tgggtggcgta 6540
tacctgtaat ccagctact cgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa ccagggagtc 6600
agaggttgca gcgagaggag attgtgccac tgcattccag cctggcaaca gagcaagact 6660
ccgtctcaaa aaagaaacaa caacagcaac aacaacaaaa aaacataaa aaagttcggg 6720
cacggtggct cacacctgta atcccagcac tttgggaggc caaggtgggt agatctcttg 6780
aggtcaggag ttcaagacca gcctggccaa caaacatggt gaaaccccg tctactaaa 6840
aatacaaaaa gtagccgggt gtagtcccag ctactcgaa ggctgaggca ggagaatcgc 6900
ttcaacctgg gagatggaag ttgcagtga ctgagattgc gccactgggt gacagagtaa 6960
gactcttgct tcaaaaaaaa aaaaagaaag aaagtttaat ttaatgattc aaataatgac 7020
ctgctcgaga gataaatata aagtctaacg taagagggtg atactttttc ctctgtcctg 7080
ctgtcctcgc ccacctcac cccaagtccc aacctgattg atcagtctcc tttccctctg 7140
gtagccccac tcccatgacc gaaccgagaa gtcatgcacc cgcataagaa ctctaatttt 7200
ttttttcaaa gtcttctcac tgcccaaaaa atagtttctt tcattcccag gggatgtgaa 7260
agtgtctctc ccaattttat ttcaacctcc cagcgttcca cacatatgcc ttgcctcagc 7320
cagctttcac tgatctgcca tttccacctc ggcgtgctc ctacctgcgg aaatcctgtc 7380
catccatagt ctgatttctg ttgttccaga acattctttt tttttcccc tggaaacattc 7440
tttaagatac ctcaataaat gaaaccagag ggtatagagc agtatgaatg ggtactacaa 7500
tgtacagggg gaaatggagg ggaatatgat atactctcct cctgtatat gcttagaatg 7560
ttctagaagg atatgcttaa aaggttagca gtctggcca ggcgtgggtg ctcacgcctg 7620
taatctcagc actttgggat gccaacgcgg acggatcaca aggtcaggag ttctagatca 7680
gcctgaccaa tatagtga aa cctcatcttt actaaaaata caaaaattag ccgggtacgg 7740
tggcatgtgc ctgtagtccc agctactttg gaacctgagg caggagaatc gcttgaaactc 7800
gggaggcaga gggtgcagtg agccgagact gtgccattgc actgcagcct gggtgacaga 7860
acaggactcc gtctcaaaaa aaaacaaaaa aggtcagcag tcttaattgt cagagggcag 7920
gggacctgca tgggatggag gtttttccat gtgtccacct tttgagccct tttgcttttt 7980
ttttttaaat ctttttattg tagcaaaata gatataaaat ttaccctttt tttttttgag 8040
acaggggtct actctgttgc ccaggttgga gtgcagtggc atgatcttgg ctactgcag 8100
cctctgcctc ctgggttcaa gcgattttcc tgcctcagcc tcccagtag ctgggattac 8160
aggtgcttgc caccataccc ggctaatttt gtatttttag tagagacggg gttacgccaa 8220
gttggccaag ctggtcgcaa actcctgacc tcaagtgate cgccccctc ggccctccaa 8280
agtgtggga ttacaggcag gagccaccac gtcagccct aaaatttacc atattaacca 8340
ttttcaagtt cagaggcatt aaagtatact cacattgttg ttcaactgtc accactactc 8400
acctgcagaa gtttttcatc ttgcaaagtg aaaaccccat acccaatttc cgttcttcc 8460
tctcagcccc tggtaatcac tattctactt tttgtctact ttttgtatga atttgcttat 8520
tctaggacct aatagaagtg gagtcaaac tgtttgtcct tttgtggctg gcttatttca 8580
cccggcctta taccctcaag gtttatccat gttggaggat gcctgaattt ccttgttttt 8640



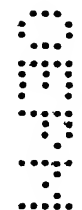
aaggctaaat tttattctat tatattaata tgtcatattt tgtttatcct gatggacact 8700
tggtgtgatt ccacctttgg ccattttgaa gaagcttcta tgtacatggg atacacatat 8760
atctttgggt ctctgcttcc aatgcttttg gggatatttc agatgtggaa tttctggatt 8820
ataaggcaat tttttttttt gagacagact ctgctcttg tgcgccaggc tagaatgtgg 8880
tggtgtgatc tttttttttt ttttttttga gatggagtct cgctctgtcg cccaggctgg 8940
agtgcagtgt cactgatctca gctcactgca agctccgcct cccagggttc tgccattctt 9000
atgcctcagc ctccaagta gctgggacca cagccgccca ccacctcacc cggctaattt 9060
ttgtattttt agtagagaca gggtttctact atgttggcca ggatggtctc gatctcctga 9120
cctcgtgatc cgctgcctc ggctcccaa agtgctggga ttacaggcgt gagccactgc 9180
acccggctgg tgtgatcttg gctcgtgca acctctgcct cccagggttc agcgattctt 9240
gtgcctcagc ctctccgcag ctgggactac aggtgtgcgc cactgtgccc agctactttt 9300
taaaaatata tgtgtattta ttatactttt aagttctggg atacatgtac agaactgca 9360
ggtttggttac ataggtatac atgtgccatg gtggtttgct gcacccatca accggctcctc 9420
tacattagggt atttctccta atgctatccc ttccctagcc ctccactctc ccggtttttt 9480
gttttggttt gtgtgtgtgt tttgttttta gtagagacag ggtctcacca tgttgccag 9540
gctagtcttg aactcctgac ctcaagtgat ccgccacact cagcctccca aagtgtggg 9600
attacagggtg tgaccacta cactcggcct tttttcact ttttatgca attttacta 9660
ttgctatatt ctaggaggca ctgtggaatt gcactgtgga attttagtat tgctgtattt 9720
cagcaagcca tgaggtctgt cagcacacgg ctttgggcat tttgtgaaga taactgatgc 9780
cagctgagcc aaggcagggt cctgattcca cccactggca ggcaccgagg tctctgctgt 9840
tactgatggt ttctctgtgg attgatgggc ttaaggccag accacagctg caatggctca 9900
cctctgcaa aggccaggct cgttggggca gagacctatt ccggactgag cctcctggtg 9960
aattagagag gtagaaaatg ggaggacggg ggcagggtgg ctattacagc gaggaaaatg 10020
cccacctga gttgtattag ataacttttg gagttcagga actttccaat aaagtgggtt 10080
ccacagcagg attacttact gactccctaa tagaaagaag gcaggcacag gccgggctgt 10140
ttggctcatg tctgtaatcc cagcacgttg ggaggctgag gcgggtggat cacaagggtca 10200
ggagatccag accatcctgg ctaacaaagt gaaacccctg ctctactaaa aatacaaaaa 10260
attaggctgg gcgtggtggc tcgtgcctgt aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 10320
cggatcacga ggtcaggaga tcgagaccgt cctggctaac acggtaaaac cccatctcta 10380
ctaaacatac aaaaaaaaaat tagccagggt tggtggcggg cgctgtagt cccagctact 10440
caggaggctg aggcaggaga gtggtgtgaa ctggggaggc gcagcttgca gtgagccgag 10500
actgcgccac tgcactccag cctgggcaac agacagagac tccgtctcaa aaaaaaaaaa 10560
aaaaaatata aaaaattagc caggcgtggt ggcacgtgca cgtgactgta gtcccagcta 10620
cttgggaggc tgaggcagga gaattgtttg aaccgggag acggagggtt cagtgagccg 10680
agatcgcgcc actgcactcc agcctgggtg acagagctag actccgtcaa aaaacaaaaa 10740
acaaaaaaca aaaaaacaaa aaaaaaaaaa cagcaggaac tggcagggtct tccctgaaga 10800
gataaaaaaa aaaaaatgca gttgcaacac aaaagcagcc acagagaaaa gcaaaccat 10860
atatggtatt tattatgcac cgagtgtggc tctaactact tttttttttt taattgagag 10920
acagcctggc tctgttgatt gggctggagt gcagtggcgc gaccgtagct cattgcagcc 10980
tcaacctcct tggctcaagc aatcctccta cctcagcctc ctgagtagct gggaccacag 11040
gtgtgagcca ccacgcctgg ctaattgttt tttttttttt tgtagagaca ggggtctcact 11100
atgtggccca ggctggtttc caactcctgg gctcaagtga tccctcccacc tctgcctccc 11160



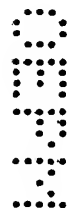
aaagtgctgg ggattacagg catgagccac ctgcctggc ctctagtcgc tttatatatt 11220
ttaacttaat cttacaaga gccctgtgag ctagttacag gagcacaat ggaaaccaag 11280
aaacagaaaa atttatcagc atgactcagt cctcagagcc atgtatggcc gtgtccgtgc 11340
atggcaggca ggtcaggggc ctggggaacg ctgttctgga aaccttggcc aggcttggc 11400
acccgaggaa tgtgcttttc agagtttttg tggctctttt ccagacctgc cctgacctct 11460
agctctggga actatgtaag ccaagtgcct tccgggaagg gagtccctct cctggtaact 11520
ctttctgggt aaccagatgt ggactcatga cacacactga gcctacgtct tataattttt 11580
tgtttttggt tttgagacag tttcggctct cttgcccagg ctggagtgc atggtgcgat 11640
ctcggctcac tgcaacctct gcctcccagg ttcaagcgat tctcctgcct cagcctccct 11700
agtagctgga attgcaggca tgcgccacca cgcctggcta attttttgta tttttttttt 11760
tttagtagaa acgggggttc acctgttag ccaggctggt caccaactcc tgacctcagg 11820
tgatccgccc acctctgcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagac agctgtgagc 11880
caccacgccc ggcgcatttt tttttcttt tttttcagag ggagtgtccc tctgtcaccc 11940
aggctgaagt gtagtggcgt gatctcggcc cactgtaacc tctatctccc aggttcaagt 12000
gattctcctg actcagcctc ccaagtagct gggactacag gcgcctgcta ccatgcctgg 12060
ctaatttttg tagtttttagt agaaaccggg ttttgccatg ttggccaggc tggctctcaa 12120
ctcttgactt caggtgatcc acctgccttg gccttctgaa gtgctgggat tataggcat 12180
gagccactgt gactggccat cttaaatttt ttttttttt tttttttttt ttgagacagg 12240
gtttcactct gtcgccagg ctggagtgc aaggcgcgat cttggttcac tgcaagctcc 12300
gcctcctggg ttcattgccat tctcctgcct ctgcctcatg agtaactgag actacaggcg 12360
cccaccacca cgcgcggcta atttttttgt attttttttag tagagatggg gtttcacctt 12420
gttagccagg atggtctcga tctcctgacc tctgtatcca cccgtctcgg cctcccaaaa 12480
tgctggcatt acaggcgtga gccaccgcac ccagccttaa atttttttt aagggaatc 12540
aaaccagtg atattgggccc agtacagtgg ctcacacctg taattccacc actttgggag 12600
gctgaggcag gtgaatcacc tgaggtcagg agttcagagc cagcccggca aacatggcga 12660
aaccctgtct ctactaaaaa taagaaaatt agccgggct agtggcatgc acctgtaatc 12720
tcagctactc gggaagctga ggcattgaaa tcgcttgaaac ctgggagcag gacgttgacg 12780
tgaaccgata tcacaccact gcactccagc ctgggtgaca gagcaagact ctgtctcaa 12840
aaaaaaaaa aaaaaaaatc cagtgatact tactttttaa atttttatct acttattttt 12900
tgctttaagt tgaatcttta aacttatctt tttttttgag acacagtctc actctgtcgc 12960
ccaggctgga gtgcagtggg acaaccacag ctcagtgcag cgttgacctc ctgggctcaa 13020
gccatcctcc cgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggcgcacac aacctgttcc 13080
agcttatctt tgtatttttt gtagagacag ggtcccactg tgttgccctg gcttgttctg 13140
aactcctagg ctcaagtgat cccccgcct caccctcca aagtgtctggg attacaggca 13200
tgagccacca catccagact tcactttttt gttaaatgtc gcaaatggca taaggaatgg 13260
gattcaatgg ggacacattt ataaacgttg cagcagctcc tagaacttgc ctatccttgt 13320
aaacttctct aggtgattgc taattacttc tttttttttt ttttttttg agacggagtc 13380
tactctgtc gccaggctg gactacagtg gcgcaatctc gtctcactgc aaactccacc 13440
tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccagat agctgggact acaggcacc 13500
gccaccacgc ccggctaatt ttttgatatt ttttttagta gaggtggggg ttactgtgt 13560
tatccaggat ggtcttgatc tcctgacctc gtgatccacc tgcctcagcc tcccaaagt 13620
ctgggattac aggcgtgagc caccatgccc agcccgttaa ttatttcaat ttgacctga 13680



cactgagcct gccaaagtagg ttcaagcatt ttgatggccc ctttacagggt tgggaaagct 13740
 aatttatctg tccaaggccg aattctgaaa ctgagtcctta actgccaaaa attcttatca 13800
 tcaatttctt cttctgggtt gggcacagtg gctcatgcct gtaaagccag caatttgaga 13860
 ggcacatga tgcaagagga agaggattga gtgaagctag gagtttgga ccagcctggg 13920
 caacatagtg agaccccatc tataaaaaaa aattaaaaat tagttgggca tgggtggtgca 13980
 ctctgtggt cctagctatt caggaggctg aggtgggagg attccttgag ccaggggtg 14040
 acgctgcaga gagctgtgat cagccactg cagtcagcc tgagtgcag ctggaaataa 14100
 tgataataa ataataata attatttaa aaattataat aaaaataatt aaaaaattat 14160
 tttcctgat taatctttt tttgtcctt ctgagagttc aatttgcctt tttctgcct 14220
 ggtctcctag gtttccctaa aatcctgctg agaggttagc actgcctgcc aaagtcagtt 14280
 tgcaaaatcc cagagaaatc cagcttattc ctgggggaac cgccaagact gccagccct 14340
 gtgtggggtt caggcaagtt tctcacatgt gccttttgg caagaggcct ctggcaacct 14400
 catgagtcct caaagagact caattctaaa agttggtctc caccagctct ctgtggctta 14460
 ggggttcaag ttcaactgtg aaagccctgt tttgtttga ttttgcttg agggagagga 14520
 aaccgccctt ctgtttgtt aactccttct cctaagggga gaaatcaata ttacgtcca 14580
 gactccaggt atcgtacaa ttgattttt agatgtttat actcagccaa aggcgggatc 14640
 ccacaaaaca aaaaatattt ttttggtgt acttttgtga agattttatt taaattcctg 14700
 attgatcagt gtctattagg tgatttgga taacaatgta aaaacaatat acaacgaaag 14760
 gaagctaaaa atctatacac aattcctaga aaggaaaagg caaatataga aagtggcgga 14820
 agttcccaac attttttagtg ttttcctttt gagccagaga ggacaatggc attaggctat 14880
 tggaggatct tgaaaggctg ttgttatcct tctgtggaca acaacagcaa aatgttaaca 14940
 gttaaaccatc gagaaattt aggaggatct ttcagaagat gcgtttccaa ttttgagggg 15000
 gcgtcagctc ttcaccggag acccaaatc aacaaatcaa gtcgcctgcc ctggcgacac 15060
 tttcgaagga ctggagtggg aatcagagct tcacgggtta aaaagccgat gtcacatcgg 15120
 ccgttcgaaa ctctcctct tgcagtgagg tgaagacatt tgaaaatcac cccactgcaa 15180
 actcctcccc ctgctagaaa cctcacattg aaatgctgta aatgacgttg gccccagtg 15240
 caatcgcggg aagccagggt ttccagctag gacacagcag gtcgtgatcc gggtcgggac 15300
 actgcctggc agaggctgag agc atg ggg ccc tgg ggc tgg aaa ttg cgc 15350
 met gly pro trp gly trp lys leu arg
 -21 -20 -15
 tgg acc gtc gcc ttg ctc ctc gcc gcg gcg ggg act gca g gtaaggcttg 15400
 trp thr val ala leu leu leu ala ala ala gly thr ala v
 -10 -5 -1 1
 ctccaggcgc cagaataggt tgagaggag cccccgggg gcccttggga atttattttt 15460
 ttgggtacaa ataactactc catccctggg agacttggtg ggtaatggca cggggtcctt 15520
 cccaaacggc tggagggggc gctggagggg ggcgctgagg ggagcgcgag ggtcgggagg 15580
 agtctgaggg atttaaggga aacggggcac cgctgtcccc caagtctcca cagggtgagg 15640
 gaccgcatct tctttgagac ggagtctagc tctgtcggcc aggatggagt gcagtggcac 15700
 gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc gggtttaage gagtctcctc tctcagcctc 15760
 ccgaatagct gggattacag gcgccaacc accacgccc cctaattttt gtatttttag 15820
 tagagacggg ttttcacat tttggccagg ctggtctcga accccgacct caggatgatct 15880
 gcccaaaagt gctgggatta caggcgtcag ccaccgcgcc cggccgggac cctctcttct 15940



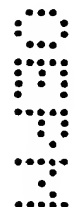
aactcggagc tgggtgtggg gacctccagt cctaaaacaa gggatcactc ccacccccgc 16000
cttaagtcct tctgggggcg agggcgactg gagaccgga tgtccagcct ggaggtcacc 16060
gcgggctcag ggggtccgat ccgctttgcg cgacccaggg gcgccactgc catcctgagt 16120
tgggtgcagt cccgggattc cgccgcgtgc tccgggacgg gggccacccc ctcccgcgcc 16180
tgccccgcc cctttggccc gcccccgaa ttccattggg ttagtccaa caggccaccc 16240
tcgagccact ccccttgtec aatgtgaggc ggtggaggcg gaggcgggcg tcgggaggac 16300
ggggcttgtg tacgagcggg gcggggctgg cgcggaagtc tgagcctcac cttgtccggg 16360
gcgaggcggg tgcaggggag gcctggcgtt cctccgcggt tcctgtcaca aaggcgacga 16420
caagtcccgg gtccccggag ccgcctccgc gacatacacg agtcgccctc cgttatcctg 16480
ggccctcctg gcgaagtccc cggtttccgc tgtgctctgt ggcgacacct ccgtccccac 16540
cttgtcctgg ggggcgccct cgccccacca gcccgatca agttcacaga ggggcccccg 16600
gccaccctca aggcctcggg tccttacgag gttgaaacgt tgcctcagaa tctccccgcc 16660
cctccttggg ctgcagccga gatcttcagc cacgggtgggg cagctatccc ccgggaccga 16720
ccccctgggg tggcctcgct tcttcagagg ctgtgaatgg cttcggttca gctgtccaag 16780
cggcgatttt tctctgggg gaaatggatt agattttaga tttccacaag aggctggtta 16840
gtgcatgac ctgagttaga gctttttagg tggctttaaa ttagttgcag agagacagcc 16900
tcgccctaga caacagctac atggcccttt cctcctgag aaccagccta gcctagaaaa 16960
ggattgggat tgccctgatga acacaaggat tgcaggaaac ttttttttta attggcaagg 17020
gggttggttt tgactggatg gagagctttg aactgccttg aaattcacgc tgtaactaac 17080
acaccagttt cctctgggag gccagagagg gagggagggt gtaatgaaat acggatgatt 17140
gttcttttat ttttatttac ttatttattt ttttaactttt ttagagatg aggtctcgct 17200
tggttgtca ggctgggtctt gaactcctgg cctcaagcga tcctcctacc tcagcctccc 17260
aaagtgttg gattacagga gtgagccacc gcgccccacc ggggatgatg atgattgcaa 17320
acattctgcc actcagtttt acaaaagaaa gagaggcact ggattaatgt gtatctcact 17380
caccaatcaa cctcttcctt aagagaaaat gttaagggaag tcttaggcaa ggccttgttt 17440
gttcatcact ttagtttctc tctcccggga tggctgagaa tgtgatgttt cctctggtgt 17500
caaggagact acaccctga tgttttcctc cagacttctg agagctgggtg tgtgtttcta 17560
gcactttcta gctgcaccac ctacgcgtgt agctggcttc aaggcatatc caggggggag 17620
tttcttgtec atttccttta caaagggaag ttgttggaat ctgaaccgca agccttcact 17680
tagacaaaa tcaggcaaca gcggtgagcg cagctccaaa cgtgtcaatg actacccaa 17740
atgtgagtaa gggagttggc tgctttaacg agccgcaggg tgattccctt gtcatttccg 17800
gaaataccta tcttcaggg aacactggga aaaaacaggg agacctttgt tgagacagaa 17860
aacctgtagg ggaattctgt tcctcattcc tgccttctc ttagacttc ctccctgata 17920
agatccaatt ctgatgggt cggttgcctc ttgctttgat ggggtgctttg atgggcttta 17980
ttattattat tattattatt attattattt tgatgggctt tttgatgtcc cttttccttc 18040
cacactctgt cccaactgtc aagcaaatag ccttttggtg ctaagagact gcagatgtaa 18100
ccgaccagca gcaaacagtg agtcaggctc tctctccgg aagcaaaatc aattgctgag 18160
atcactctgg ggaaaatacc caccttattt ggaaagaagc actgatcaat tgatgtctat 18220
ttttttttt tttgagttgg agtctcgccc tgtcaccag gctggagtgc aatggcataa 18280
tctgcctca ctgcaatccc cgcctccgg gttccagcaa ttctcctgcc tcagcctcct 18340
gagtagctgg aattataggc gcctgccaca acaccgggt aatttttgta tttgtagtag 18400
agatgggggt tcaccacgtt ggccaggctg gtctcgaact cctgacctcg tgatccacce 18460



gcctcagcct cccaaagtcc aaggattgca ggcgtgaccc actgtgccag ccaatcaatt 18520
gattttctcat tcatttttcag ctggctctgt tcccttaagc caggggattt tcgtttgttt 18580
gtttcccctt caaggaaatg attctagcta cagttttgat ttccttgtag aactgttttc 18640
agtagcacag ggaaagaaaa catcgaaagc attcaccacc tcatttgtgt gctgggggaa 18700
aaagcagaaa tgtgtattct ctttttttgt ttcgatgacc ttgttcctga cttgttactc 18760
gtgacttgag agatcagagg gctagaggac tagaatttat agagggtgtt tttttgtttg 18820
tttatttttg ttcgagttgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg ctactgcaa 18880
cctctgcctc ccaggttcaa gcgattcttc ggctcagcc tcctgagtag ctggaactac 18940
aggcgcccgc caccacaccc agctaatttt tgtatttttc agtagagatg ggatttcacc 19000
atattggtca agctggcctc gaactcctga cctcgtgac caccgcctc agtttcccaa 19060
agtgcctggga gtacaggcgt gagccgcgt gcccggcctt tttgtgtttt tgtgtttttg 19120
agaggagctc attgcttttt aggcctccct agcgtgagaa aatctgggga tccatgctct 19180
agtttacttc cttttttttt ttttttttga gatggagtct cgcttagatt gcctaacttc 19240
agctcattgc aacttctgcc tccgggggtc aagggttct cgtgtctcag cctcctgggt 19300
agctaggata cgggcacccg ctaccatgcc tggctaattt tgtactttta gtagagacag 19360
ggtttcgcca cgttggccag gctggtctcg aactcctgac ctccaggtgag ccgcctgcct 19420
tggcctccca aagtgcctgag attacaggcg tgagccaccg cgcttgccct aatttgcttt 19480
tcctgaaatt caaatggtct aatatgaaaa acgccaacct tgcttgaaag aataagaaag 19540
agggtcgggt tcgttggggt gttgatgttt ggaacaggac tggttttgtc cccttgctcg 19600
gaaagggcag caactgtgag gacagctccc tgacgtgctc tactcagca ctgttccgtt 19660
cctgagcact gtccccacta gctaggccaa gggagctcat ttggcaggca actgctgtct 19720
ggctgcgct gtggcagtaa aatctgcctt tatttttttg aggcagggtc ttgccctgtc 19780
gctcaggctg aagtgtgcag ttatagctca ctgcagcctc cagcttctgt actcaactga 18940
tcctcctctc tcagcctcct gagtagctgg gactatacgc acgtgttacc actcccacct 19900
cagtttgttt gtttatttat ttatttattt atttattgag atggagtttt gctcttgctg 19960
cccaggctgg agtgcaatgg cgcgatctcg gctcaccgca acctccacct cctggttcaa 20020
gcgattctcc tgccctagcc tcctgagtag ctgggattac aggcattgac caccacgccc 20080
ggctaatttt gtatttttcg tagagatggg gtttctccac attggttcag gctgttctcg 20140
aactcccaac ctccaggtgat ccaccgcct cagcctccca aagtgcctggg attataggcg 20190
tgagcccccg aaccgggcca ctcccagcta agtttaaatt tttgttttgt ttgttcgttt 20260
gtttttattt tttagacag agtctccgc ccaggctgga gcgcagatca ctgcctcctt 20320
gacctcccag gcttaagcca tcctcccac tcagcctccc aagtagctgg gattacaggt 20380
gtgtgccact atgcttggct aagttgtgta tttttgtag agatgggggt caagggattc 20440
tcgctttgtt gcctcggttg gtctcaaact cctgggctca agcagtcctc cctcctcagc 20500
ctcccaaggt gctggggaaa tccacttttg aaacattgtc tggagagttg ccaggtggt 20560
agatcacaga aataggtcat cgtgggggtc tcccatggg tgagtcctt agccacctgt 20620
ggccagcaaa tatttgaga ataatagtca ggggagagct tgaggtccag ggaaagggtt 20680
tgtttttctt cagggaaagg tttttattgt tctttatccc tccttaaagg accttcaggt 20740
gttactgaca ttcccggtct acccagtggc acatttagtt tgtaagctgg gccctcgtag 20800
agaggtaggg aggtgagagc attggattag tggtcaccaa agctgcggtc acctagtggg 20860
gtgatcagag gctcctccct taagatcttg attgccaacg cctctggccc aactttcctt 20920
tttatttatc gcaagcctcc tggaaatctca attgcttttt gccaccccg tgtgtcagca 20980



caagaaatga gtcatttcct cctttaagca cagttgaaat tgagctgtga gtcagtgagg 21040
tgtgtacgat attgtcaaag cggggtgtgt acagtattga cagatctgta gttgggcaag 21100
agaattatca gagtttgtga ccacagcaga ttccaaagct cgactcattt tcttctctct 21160
tccttccctt ttttcttttc tttttttttt tttttttgac agagtctcgc tctgttgccc 21220
aggctggagt gcagtggcac aatctgggct cactgcagcc cctgcctcct gggttcaaat 21280
gattctcatg tttcagcctc ccgagtagct gcaattacag gcattcgggt tcaagtgatt 21340
ctcctgcctc agccacctga gcagctggga ttacaggcgc ccgccaccac gcccggttaa 21400
tttttgtatt ttagtagag acgggggttc accatgttgg ccaggctggg ctggaactcc 21460
tgaactcagg tgatccgccc acttcggcct cccaaagtgc tgagattaca gacgtgagtc 21520
accgcgcccga gcctgttctg ttctttaatt ctcaaaacac cctctaggaa gtagagactg 21580
ccattctccc ccattttaca gatcaggaaa ctgagtccca gaaggattta gtcagttacc 21640
caagttgttc tagttaaatg gcctggaaag ccagtgaagc ccaggattgt ctatctaacc 21700
cccttactac tctaactttc agggaaatcca catgaatgtg ctgggtcaac catcaaagtt 21760
gaaatggata aagggggctg gatgcgggtg ctgatgcctg taatcctagc actttgggag 21820
gccgagatgg gtgggtggat tgcttgagcc caagagtttg agaccagcct gggcaacata 21880
gtgagacacc tgtctctgca aaaaataaat aaaaagttag ctgagtgtga tgggtgcacc 21940
ctctagtac agctgttgag ttaggcttag gcaggaggat cgcataacc tgggaggtgg 22000
aggcgccgt gagcctcagt catgccactg cactccaacc tgggcaacag agtgaaagcc 22060
ggtgtccgaa agagaaagaa aaaaagacat agatacatct ttaaaagtta ggttgtatgt 22120
taattacct caactcagtt tcaactgtgc ttaaaggagg aatgactca tttcttgcta 22180
catatcaaat tagcccaaaa ttagtgggt taaaacaaca catttatgat ttctcagttt 22240
ttgcgtgtca ggaatttga agcagcacag ctgacgggt ccagctcagg gtctctcatg 22300
aagttgcaat caaaatattg gcaggagaga aaacatatt ttcagaagct gcaggcatag 22360
gaagacttgg ctggggtga aggatccact tccaagatgg cgcactcagt ggctcttggc 22420
tgaggcctc agttccctgc tgcgtggagc tctccctcca gctgcttgag tggactcatg 22480
acatgcagct ggcctcccct ggagcagtcg atccaacaat gagcatggcc atgaactagg 22540
ctcagaagcc actccctgtc gtctctacat tttcctatca gaagcaagtc attaaaagtc 22600
cagtgccact ccaggggaga cgaattaggc tctgcctctt gaaaggatta tcacagaaga 22660
tgcggtccta tattcttttt taaaattat tctttttttt attttgtaga gatgggtct 22700
tggtatgttg cctaggccag tctggaattc ctgggctcaa acaatcctgt ctctgcctcc 22780
caaagtgttg ggattacagg catgagccac tgcacctggt catgtggtca tattttcttt 22840
ttcttttttt tttttttttg agacagagtc tctgtcgcgc aggctggagt atgggtggct 22900
gatctcagtt cactgcagcc tccgcctccc gggttcaagc gattctcctg cctcagcctc 22960
ctgagtagct gggattacag gcgcccgcga acatgcccg ctaatttttt tagtagagat 23020
ggggtttcac catgttagcc aggatggtct cgatctcctg atttggtgat ccgccacct 23080
tggcctccca aagtttcaac catcgatcag aacttattga tgtacttatg tagctaggca 23140
cgggtggcgc tgctgtaat ccagctact tggaagggtt aaggcaggag aatcgcttga 23200
acctgggagg cagaggttac agtgagtcaa gatcatacca ttgcactcca gtctgggcaa 23260
cagaatgaga ctctgtctca aaaacaaaaa acaaaccctt gtatgtgatt ttcttgata 23320
gcatctgtta catcttcaca aagataaaaa gtcagacttg gctgggcatg gtggctcaca 23380
cctgtaatcc cagcactgag aggctgaggc aggcagatca cttgaggtca ggaatttgag 23440
accaggctgg gcagcatggt gaaaccccg ctctacaaaa aatacaaaaa ttagccgggt 23500



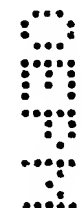
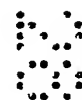
gtggtgtcac gcacctgtat tcccaagcta ctcaggaagc taaggcagga gaatcacttg 23560
aaccagagg tggaggtttg cagtgaattg agattgtgcc attgcactcc agcctgggag 23620
acagagtga actctgtgtc aaaaataaaa taaaataaaa ttttaaaaaa ggcagatttt 23680
tttttcttct tggattgtt acctattat agtaataata agtgcatagt gcatgctgag 23740
ataagcaatc ataatttgtt attgcggccg ggcattggtg ctcagccta taatcccagc 23800
actttggtca ggagttcaag gccagcctgg ccaatatagt gaaactccat ctctactaaa 23860
atacaagaaa ttacctgggc atggtggcag ttgctggtga tccccagcta cttgggaggc 23920
tgaggcagga gaatcgcttg aacctgggaa gcagaggttg cagtgaacca agattgcacc 23980
actgcactcc agcctgggtg acagagtga actctgtctg aaaataataa taataataat 24040
ttgttattgc ttttattgcc ttagtttaca tagggaatca aagtttatac tttgatttat 24100
aaaagttgct ttgattctag ttcacagaac cagaatcttt catataaagg tattagaggg 24160
cccagtgtgg tggctcatgc ctgtaatccc agcatattgg gaggctgagg agggaggatc 24220
actttaggag tttgaggcca gcctaggcaa catagtga ccttgtctct aaaaaaatt 24280
ccaacattag ctgggcatgg tggcatgtgc ctgtagtccc atttatttgg ggggctgagg 24340
caggaggatc acttgagccc acgaggttca atccaggttg cagtaagcca tgatcctgcc 24400
actgcactcc agtttgggta acagagcgaa gctatgtctc aaaaaagaa aaaaaagta 24460
ttctaaatcc aaatttaata tataaaacta aatgcaggcc aagtgtggtg gcatatacct 24520
ataatcaca cactttggga ggctgaggtg ggaggattgc ttgagcccaa gatttcaaga 24580
ccagcctagg taacacagta agaccccatc tctacaaaaa gtagaaaaat tagcctggca 24640
tggtggtgag tgcttttaac cccaactact tagggggctg agatgggaag attgcttgag 24700
cctcagagtt tgaggctgca gtgggccgtg atcgtccac tgatcgctct aaagtgaac 24760
cctgtctcaa aaaaaagaa aatagaagaa aactaaatac attcaataag actttgatct 24820
cttttccaag gtgtaaatat attttgggaa attttccagt tactttgttc catttttaac 24880
gtaataatct aagtcttggc tttctaagga aaagtttct cttattatat cttttgttaa 24940
tgtttctctc ccatttcttt tgatctgac ttcagatata tgattatctt cactgctaaa 25000
tttgtgtct ctggcctcta catttataac ttttcataac tttttatcta agtatttctt 25060
ccctacctac tgaagaaaac tcaagttttc ttccacctta atgattatgc tgtgtctgtg 25120
agttttcttc atgactcttt acagtacaag ttttttgttc ttgtttttt aatggtcaga 25180
tgatagaac aacacaggtt ttgtttgttt tgttttaact ttaaaaaa ttataataga 25240
taaagggtct cactacgttg tccaggtga tctcactc ctgggctcaa gcaatccacc 25300
cacctctgcc tcccaaagtg ctgggattac agtcatgagc caacatgcct gggcagtaca 25360
ggtttttttt gagacggagt tttgttcttg ttgccgaggc tggagtgcaa tggcacaatc 25420
ttggctcacc acaaagtctg cctcccaggt tcaagtgatt ctctgcctc agcctcctga 25480
gtagctggga ttacaggcat gtgccaccac gccagctaa ttttgtattt ttagtagaga 25540
cggggtttca catgttggc caggctggtt tgaactgct gacctcaggt gatctgccca 25600
cctcggcctc ccaaagtgtg gggattacag gcatgagcca ccatgccag ctgtagtaca 25660
ggttttaata tgctaaatac ttttctttt tttattaatg tgcatggaag ttctaataat 25720
tttttccat acccagaga gtccatattt tggaaatcaac aacactagcc tttgttgaca 25780
agtgtctctc ttgggttctt ttttgtgtc ctccactgaa ttttggggtt cataaaattt 25840
catttgttgt gcttgcttaa ttccctggga atcagactgt tctgatcgg atgacatttc 25900
tggttaattc tttagttggc aggaaataga cacaggaaac gtggtcagtt tctgattctg 25960



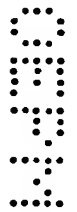
gcgttgagag accctttctc cttttcctct ctctcag tg ggc gac aga tgc gaa 26014
 al gly asp arg cys glu
 5
 aga aac gag ttc cag tgc caa gac ggg aaa tgc atc tcc tac aag tgg 26062
 arg asn glu phe gln cys gln asp gly lys cys ile ser tyr lys trp
 10 15 20
 gtc tgc gat ggc agc gct gag tgc cag gat ggc tct gat gag tcc cag 26110
 val cys asp gly ser ala glu cys gln asp gly ser asp glu ser gln
 25 30 35
 gag acg tgc t gtgagtcctc tttgggcatg atatgcattt atttttgtaa 26160
 glu thr cys l
 40
 tagagacagg gtctcgccat gttggccagg ctggtcttga atttctgggc tcaagtgate 26220
 cgctggcctc ggcctcccaa agtgctggga ttacaggcac cagcctggc ctgtgacacg 26280
 attcttaacc cttttttgat gatggcggct ggaaaagtgg ccagtggatt ttgatgtatt 26340
 caatcatgaa ttaggaggtg gggagagaat gaattattgg agctttcctt aaagccatta 26400
 aatggctcta ttgttttttc aattgatgtg aatttcacat aacatgaaat taaccagctc 26460
 agtggcatta atacatctgc aatgctgtgt ggccaccacc tctatcttgt tccaaaactt 26520
 tgcataacct aatgtctttt tttttttttt tttttgagac ggagtctcgt tccatcaccc 26580
 aggctggagt gcagtgggtg gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc aggttcacgc 26640
 catcctcctg cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcaccctcca ccacatccgg 26700
 ctaatttttt gtatcttttag tagagatggg gtttcacat gttagccggg atggtctcga 26760
 tctcctgacc tcgtgatcca cctgcctccg cctcccaaag tgctggcatt acaggcgtga 26820
 gccaccatgc ccggcctatt ttttttttta agagatggag tctaattctg ttgccaggc 26880
 tggagtccag tggtagcatc atacttcact gcagccttga cctcttgggc tcaagtgate 26940
 ctcttgctc gaactcccaa agtattggga ttacaggtgt gagccaccgc actcagccta 27000
 atgtccagtt tttaacaagc tccatttaaa tgccctccgt tttgacccat aaaggggtag 27060
 gcttgggcgg gcacaatggc ttgtgtctgt agtcccagct acttgggagg ctgaggcaga 27120
 aaggcagaaa gattgcttta taaagcccag gagtttgagg gccacctggg tggcatagct 27180
 agacctcatc tctaaaaaat aagtaataaa taaatatttg tttttgtttt tttctttttc 27240
 tttctttttt tttttttttt tgagacggag tcttgctctg ttgccaggc tggagtgcag 27300
 tggcgcgatc tcagctcact gcaagctgtg cctcctgggt tcatgccatt ctctgcctc 27360
 agcctcccga gtagctggga ctacaggcgc ccaactaccac gccagctaa ttttttgtat 27420
 ttttagtaga gatgggggtt caccacgtta gccaggatgg tctcaatctc ctgacctcgt 27480
 gatccgccag ctttggoctc ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagcca ctgagccgc 27540
 cccatatgta tgtatatata ttttttttta aaatgggaga ccaggcatgg tggctcatgc 27600
 ctagaatccc agcacttttg gaagctgagg tagggcgatc acttgaggcc atgagtttga 27660
 gaccagcctg ctcaacatga tgaaacttct atctctacta aaaaaaaaaag tgggattagg 27720
 tcaggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttca gagggcgagg caggaggatc 27780
 atgaggtcag gagatcgaga ccacctggc taacacgggtg aaaccccgtc tctactaaaa 27840
 aaatacaaaa aattagccag gcgtgggtggc ggggtgcctgt agtcccagct actcaggagg 27900



ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggcgagcct gcagtgagcc aagatcgtgc 27960
 cactgtactc cagcctgggc gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaa aaaaaaagtg 28020
 ggattgacat tctcttcaaa gttctggggg tttcctttgc aaagacagga ttggcaaggc 28080
 cagtgggtct tttttgtgtg tgtgtgtgtg acggagtctc actctgccac ccaggctgga 28140
 gtgcaatggc aggatctcgg ctcaccgcaa cctcctcctc ccagggtaaa gtgattctcc 28200
 tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggtgcccg caccacacc aactaatttt 28210
 tgtattttta gtagagacag ggtttcacta tattggccag gctggctctg aaccctgac 28320
 ctcacgtgat ccaccgcct tggcctccca aagtgtctggg attacaggcg tgagccactg 28380
 tgctcggcct cagtgggtct ttcctttgag tgacagttca atcctgtctc ttctgtag tg 28440
 eu
 tct gtc acc tgc aaa tcc ggg gac ttc agc tgt ggg ggc cgt gtc aac 28488
 ser val thr cys lys ser gly asp phe ser cys gly gly arg val asn
 45 50 55
 cgc tgc att cct cag ttc tgg agg tgc gat ggc caa gtg gac tgc gac 28536
 arg cys ile pro gln phe trp arg cys asp gly gln val asp cys asp
 60 65 70 75
 aac ggc tca gac gag caa ggc tgt c gtaagtgtgg cctgccttt 28581
 asn gly ser asp glu gln gly cys p
 80
 gctattgagc ctatctgagt cctggggagt ggtctgactt tgtctctacg gggctctgct 28641
 cgagctgcaa ggcagctgcc ccgaactggg ctccatctct tgggggctca taccaagcct 28701
 cttccgccct tcaaattccc ccttgaccag gaggcattac aaagtgggga tgggtgctacc 28761
 tcttcgggtt tgtcacgcac agtcaggag gctgtccctg ccgagggcta gccacctggc 28821
 acacacactg gcaagccgct gtgattcccg ctggtcgtga tccccgtgat cctgtgatcc 28881
 ccgccccgtg aggctgaaca catagtgacg cttgctagcc aagcctcaat gaccacgta 28941
 acatgaaggg ggaaggcca gaaagtctct ccaaggagca aggccaagaa tcccgaaggg 29001
 aaatggactt tgaagctggg cgtcttcttg gctgtcttaa tacaagtggc acatccaaat 29061
 ccaaaacccc gaaattcaaa gtcttgagca cccgaaattc tgaaacgtct tgagcactga 29121
 cctttagaag gaaatgctta ttggagcatt ttggatttcg gatttttacc actgagtgtg 29181
 gagtcctaata taggaaaaaa accaggctga ccgaaccaa ggaaagcaat aaaagaaggc 29241
 agatagggtc aggcacggtg gctcaccct gtaatccag ccttttgaga ggctgaggcg 29301
 ggtggatcac ttgaggtcag gagttcgaga gcagcctggc caacacggtg aaaccccatc 29361
 tctactgaaa atacaaaaac tagccaggta tgggtggcgtc tgctgtaat ccagctact 29421
 cgggaggctg agacaggaga atcacttgaa cctgggaggc agaggttgca gtgagccaat 29481
 atcacgccat tgcactccag cctgggggac aagagcgaaa ttctgtctca aaaaaaaga 29541
 agaagaaggc cgacaaacta tgtaactctg cctttctcca tgggtccagaa cacacagccc 29601
 tcttgcgtaa ataactcctt atcttctctc tcccagctat catcagacac ctgggtgat 29661
 agaaaattgc aagttagctc actgcaacct cggcattata agtactgcac aaagccctct 29721
 tcagcgcaca gcacaagcac cattctataa aatctccagc aagcggccag gtgcagtggc 29781
 tcatacctgt aatcccagca ttttgggaga ctgaggcggg cggatcacct gaggtcagga 29841
 gtttgagacc agcctggcca acatgggtgaa acccgtctc tattaaaaat aaaaaaaat 29901
 tagccaggcg tgggtggcagg tgctgtaat cccagctact tggaaggctg aggcaggaga 29961



atcgcttgaa cccgggaggt ggaagttgca gtgagccgag atcttgccat cgcactccag 30021
cctgggggac aagagtgaga cttcgtctca aaaaaaaaaa aaaaaattcc cagcaagcct 30081
ttgtcttctg gcagtcagct cctctcttgc tgacctgctc attgctttct tgcaaggtat 30141
tttctacct actttctgga ataaatctgt ctttctgtac ttacaactac cttttttaaa 30201
atttctttct tttttgagat ggagtctcac tctgtttgcc caggctggag ttcagtgggtg 30261
caatctcagc tcaactgcaac ctctacctac tgggttcaag cgattctcct gcctcagctt 30321
cccagtagc tgggattaca ggcgtgcacc agcacgcagg ctaatttttg tatttttagt 30381
agagacgggg tttcaccatg ttggccaagg tggctcttgaa ctctgacct caagtgatcc 30441
tcccacctca gcctcccaa gcgctaggat tacggccatg agccactgag gccggctgca 30501
cctacaactg tcttgataaa ttcttacctc cacaccactg gtccagatag tcagtgtctca 30561
cccacaacat taaggatatt ccaaatttga aacattccaa aatcagaaaa atattccaac 30621
tctgaaaata ttccaaaatc caaaaaaatt caaaatccaa aacacttctg gtcccaagca 30681
ttttagagaa gggatactca acccaaaata aggacagcaa ttctataaat tgtgctacca 30741
tcttgacaggt ctcaagtttaa cagctttaca cctattagcg caccagtgtc catagcagtg 30801
ctgggaaatg tgtacagatg aggaaactga ggcaccgaga gggcagtggg tcagagtcca 30861
tggccctga ctgctcccca gccgccttt ccaggggcct ggcctcactg cggcagcgtc 30921
cccggctata gaatgggctg gtgttgggag acttcacacg gtgatgggtg tctcggccca 30981
tccatccctg cag cc ccc aag acg tgc tcc cag gac gag ttt cgc tgc 31029
ro pro lys thr cys ser gln asp glu phe arg cys
85 90 95
cac gat ggg aag tgc atc tct cgg cag ttc gtc tgt gac tca gac cgg 31077
his asp gly lys cys ile ser arg gln phe val cys asp ser asp arg
100 105 110
gac tgc ttg gac ggc tca gac gag gcc tcc tgc ccg gtg ctc acc tgt 31125
asp cys leu asp gly ser asp glu ala ser cys pro val leu thr cys
115 120 125
ggt ccc gcc agc ttc cag tgc aac agc tcc acc tgc atc ccc cag ctg 31173
gly pro ala ser phe gln cys asn ser ser thr cys ile pro gln leu
130 135 140
tgg gcc tgc gac aac gac ccc gac tgc gaa gat ggc tgc gat gag tgg 31221
trp ala cys asp asn asp pro asp cys glu asp gly ser asp glu trp
145 150 155
ccg cag cgc tgt agg ggt ctt tac gtg ttc caa ggg gac agt agc ccc 31269
pro gln arg cys arg gly leu tyr val phe gln gly asp ser ser pro
160 165 170 175
tgc tgc gcc ttc gag ttc cac tgc cta agt ggc gag tgc atc cac tcc 31317
cys ser ala phe glu phe his cys leu ser gly glu cys ile his ser
180 185 190
agc tgg cgc tgt gat ggt ggc ccc gac tgc aag gac aaa tct gac gag 31365
ser trp arg cys asp gly gly pro asp cys lys asp lys ser asp glu
195 200 205



gaa aac tgc g gtatgggagg ggccaggggtg ggggaggggc gtcctatcac 31415
glu asn cys a

210

ctgtccctgg gctcccccag gtgtgggaca tgcagtgatt taggtgccga agtggatttc 31475
caacaacatg ccaagaaagt attcccattt catgtttgtt tctttttttt cttttctttc 31535
tttattttgt ttttgagatg gagtctcact ctgtgatttt tttcatctct aaatttccta 31595
catccatatt gccaccatga ggccccaggc tggccgatgg ttgctgttag cttattggga 31655
aatcactgtt tggaagggtg tggttgtttt ttgtttgttt ttgtttttgt ttttgttttt 31715
gttttgagac ggagtctcgc tctgtcgcca ggggtggagtg cagtggcgcg atcagctcac 31775
tgcaacctcc gcttcctggg ttcaagccat tctcctgcct cagcctccca agtagcgagg 31835
attacaggca tgtgccacca cctccggcta tttttttttt tatttagtag agatgggggtt 31895
tcaccatgtt agtcaggctg gtcatgaact cttgacctca ggtgatccac ccgcctcggc 31955
ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgca ctgctgcacc cagccttttt ttgttttttt 32015
gagacagggg cttgctgtca cccaggttga agtaagggtg cagcattatg gctcactcgc 32075
gccttgatct ccttggctca agcgatcctc tcaactcagc ctctcaagca gttggaacca 32135
caggctgtac caccaagcct ggccaatttt ttgtacaga cacaggctgg tcttgaactc 32195
ctgggctcaa gcaatcctcc tgccttggcc tcccaaagtg ctgggattcc aggcattgagc 32255
cgctgcaccc ggcaaaaggc cctgcttctt tttctctggg tgtctcttct tgagaaaaac 32315
aacacactct gtcctgtttt ccag ct gtg gcc acc tgt cgc cct gac gaa 32365

la val ala thr cys arg pro asp glu

215

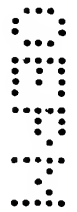
ttc cag tgc tct gat gga aac tgc atc cat ggc agc cgg cag tgt gac 32413
phe gln cys ser asp gly asn cys ile his gly ser arg gln cys asp
220 225 230 235
cgg gaa tat gac tgc aag gac atg agc gat gaa gtt ggc tgc gtt aat 32461
arg glu tyr asp cys lys asp met ser asp glu val gly cys val asn
240 245 250

g gtgagcgtg gccatctggg tttccatccc ccattctctg tgccttgctg 32512
v

cttgcaaattg atttgtgaag ccagagggcg cttccctggg cagctctgca ccagctgtgc 32572
gtctgtgggc aagtgaattg acttctcaga gcctcacttc cttttgtttt gagacggagt 32632
ctcgctctga caccaggct ggagtgtgtt ggcacaatca cagctcacgg cagcctctgc 32692
ctctgatgtc cagtgaattc cctgcctcag cctcccaggt agctgagatt aaaggcgtat 32752
accaccacgc ccggctaatt ttttgtattt ttattagaga cagggtttct ccatgtttggc 32812
caggctggtc ttgaactcct ggtctcaggt gatccacccg cctcggcctc ccaaagtgtc 32872
aggattacag gtgtgagcca ctgcgccagg cctaattttt ttgtattttt agtagagatg 32932
cggttttgcc atattgccc ggtgtgtctc gaactcctgg gctcaagcga tctgcctgcc 32992
ttggcctccc aaagtgtgtg gattacaggc acaaaccacc gtgcccagcg cgtttttctta 33052
atgaatccat ttgcatgcgt tcttatgtga ataaactatt atatgaatga gtgccaagca 33112
aactgaggct cagacacacc tgaccttctt ccttcctctc tctggctctc acag tg aca 33271

al thr

etc tgc gag gga ccc aac aag ttc aag tgt cac agc ggc gaa tgc atc 33219
 leu cys glu gly pro asn lys phe lys cys his ser gly glu cys ile
 255 260 265
 acc ctg gac aaa gtc tgc aac atg gct aga gac tgc cgg gac tgg tca 33267
 thr leu asp lys val cys asn met ala arg asp cys arg asp trp ser
 270 275 280 285
 gat gaa ccc atc aaa gag tgc g gtgagtctcg gtgcaggcgg cttgcagagt 33319
 asp glu pro ile lys glu cys g
 290
 ttgtggggag ccaggaaagg gactgagaca tgagtgtgtg aggggttttg gaactccact 33379
 ctgcccaccc tgtgcaaagg gtcctttttt tcatttttgag acagtctcgc acggtcgccc 33439
 aggtctggagc gcaatggcgc gatcttggct caccacaacc tccggctccc aggttcaagc 33499
 gattcttctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag ctgaatgcca ccttgctggg 33559
 ctaatttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg ttggccaggc tggcctcgaa 33619
 ctctgacct cgagtgatct gccgcctcc tgaagtgtg ggattacagg cgtgagccac 33679
 ctgctcctgg tgagggtttt ttttttccc caacctctg tgggtggatac tgaaagacca 33739
 tattaggata actgtacagt atagagaagg cagtggcaag ttttctctgt catataccag 33799
 agtgggcttg ggcattgggtg catactcctg tagtctcagc taatcaggag gctgaggaag 33859
 gaggatcgct tgggcccagg agttggagac tgtagtgagc tgtgatcaca ccaccacact 33919
 tcaatctggg caacagagca agagacccta tctctaaaaa aaagtaagta tttcggacac 33979
 tgtggggccat acggtctctg gtgcagtttc tcaacatggc tgttgggtga acacaaccac 34039
 gcacagaacg caaaccaata cacgtggctg tgggcccaga aaatgttatt tatggacaca 34099
 aaaattggaa tttcatataa ctgttttgtg tcatgaaaat gatttccctt tttattttta 34159
 tttttcttct caagtattta aatatgtaaa agccattttt aggcctggca ggatgggttca 34219
 cagctgtaat cccagcactt tgggaggctg aggcgggagg atcacgaggt caggagatcg 34279
 agaccatcct ggccaacaca gtgaaacccc gtctctacta aaaatacaaa aaattaacca 34339
 ggcttgggtg cgcgcgctct tagtcccagc tgctcaggag gctgaggcag gagaatcgct 34399
 tgaatgcagg aggcggaggt tgtagtgagc cgaggttgca cactgcact ccagcctgag 34459
 cgacagagtg agagtccgcc tcaaacaaaa aaatgtttgc ccatgctggg cttgaactcc 34519
 tgggctcaag ctatctgcct gccttgggtc cccaaagttc tgggattaca ggcattgagct 34579
 acagcgcccg gacttttgtt gttttatatc tatatatcta tatataactt gttttatgta 34639
 tatatataac ttgttttata tatatacata aactgcagta aaaaacatgt aacataaaat 34699
 ttaccttctc aaaccttatt aagtgcacag ttctgtgcca ttagcaaatt cacactgttg 34759
 tacaacatca caaccaccat ctccagaact tttttttttt tttttattct ttttgagaca 34819
 gagtctcact cgtcgacagg gctggagtgc agtgggtgca tctcggttca ctgcaacctc 34879
 cacctaccag gttcaagcaa ttctcctgcc tcagccccct cagtagctgg gattacaggt 34939
 gccgctcta ccacgcccag ctaatttttg tatttttcagt agagactgac tgggtttcac 34999
 catgttggcc aggtctgtct cgaactcctg acctcaagt atcctccac ctcagcctcc 35059
 caaagtgtg ggaatacagg catgagccac tgcgcccggc ccagaactc ttttatcttc 35119
 ccaaactgaa gctctgtccc catgaaacac tcaactctca tccctcccc aactcctggc 35179
 acccaccatt ctactttctg tccctatgaa tgtgatggct ctagggacct cctctgagtg 35239
 gaatcagaca gcattttcct tttttgactg gcttatttca ctgagccaag tgcggtggca 35299



cacgcctgta atccccaaac tttgggagac cgaggcgggc gcatcaccag aggacaggag 35359
nncgagacca gcccggccaa cagggggaaa ccccatcact agggagcctg cagaaagaaa 35419
gccaccacat ggcttgctgg agccacacaa tcccagcaaa acaggggacgc taaacgtagg 35479
agaaacacac aaccccagga ggcggaggtc gcagtgagcc gagatcgtgc cattacactc 35539
cagcctgggc aacaagagtg aaactccgtc tctcctaaaa atacaaaaaa attagctggg 35599
catggtggca catgcctgta gtcccagcta cttgggaggc tgaggcagga gaatcacttg 35659
aaccggggag gtggagggtg taatgagcca aggttggcgg cgaagggatg ggtagggggc 35719
cgagagtgc cagtctgcat cccctggccc tgcgcag gg acc aac gaa tgc ttg 35773

ly thr asn glu cys leu

295

gac aac aac ggc ggc tgt tcc cac gtc tgc aat gac ctt aag atc ggc 35821
asp asn asn gly gly cys ser his val cys asn asp leu lys ile gly
300 305 310
tac gag tgc ctg tgc ccc gac ggc ttc cag ctg gtg gcc cag cga aga 35869
tyr glu cys leu cys pro asp gly phe gln leu val ala gln arg arg
315 320 325 330
tgc gaa g gtgatttccg ggtgggactg agccctgggc cccctctgcg cttcctgaca 35926
cys glu a

tggcaaccaa acccctcatg cctcagtttc cccatctgtt aagtgtgctt gaaagcagtt 35986
aggaggggtt catgagattc cacctgcatg gaaaactatc attggctggc cagagtttct 36046
tgcctctggg gattagtaat taagaaattt caggccgggt gcgtaatccc tgtaatccca 36106
acaccttggg acgccgaggc gggcagatca cctgaggtcg ggagttccag accagcctga 36166
ccaacatgga gaaaccccg tctactaaa aatacaaaat tagccgggct tgggtggtgca 36226
tgcctataat cccagctact caggaggctg aggcaggaga atcacttgaa cctgggagggt 36286
ggaggttgtg gtgagccaag atcgtgccat tgcactccag cctgggcaac aagagtgaaa 36346
ctccatccaa aaaaaaaaga aaagaaaaga aaaaaaagaa aagaaatttc agctgacaca 36406
gcttcacact cttggttggg ttcccgtggt gaatgatgag gtcaggtgat gactggggat 36466
gacacctggc tgtttccttg attacatctc ccgagaggct gggctgtctc ctggctgcct 36526
tcgaaggtgt gggttttggc ctgggccccca tcgctccgtc tctagccatt ggggaagagc 36586
ctccccacca agcctcttct tctctcttcc ag at atc gat gag tgt cag gat 36638

sp ile asp glu cys gln asp

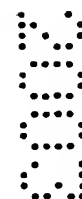
335

ccc gac acc tgc agc cag ctc tgc gtg aac ctg gag ggt ggc tac aag 36686
pro asp thr cys ser gln leu cys val asn leu glu gly gly tyr lys
340 345 350 355
tgc cag tgt gag gaa ggc ttc cag ctg gac ccc cac acg aag gcc tgc 36734
cys gln cys glu glu gly phe gln leu asp pro his thr lys ala cys
360 365 370
aag gct gtg g gtgagcacgg gaaggcggcg ggtgggggcg gcctcaccoc 36784
lys ala val g

375

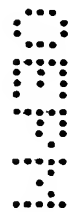
ttgcaggcag cagtgggtggg ggagtttcat cctctgaact ttgcacagac tcatatcccc 36844

tgaccgggag gctgtttgct cctgagggct ctggcagggg agtctgccgc cctgttagga 36904
 cttgggcttg ccaggggat gctgcatat gtcctagttt ttgggaatat ccagttaacg 36964
 gaaccctcag ccctactggg ggaacaggaa cgggctttcc ttccagggac aacctgggga 37024
 gtgacttcaa ggggttaaag aaaaaaatt agctgggcat ggtgccacac acctgtggtc 37084
 ccagctactc agaaggctga ggcgggagga ttgcttgagg gcaggaggat tggttgatcc 37144
 tcccacctca gctccggag tagctgggac ctccaggtgca tgccactatg cctgggcta 37204
 tttctttttt cttttttttt ttttttcgag acggagtctc gctctgttgc ccaggctgga 37264
 gtgcagtggc aggatctcgg ctactgcaa gctccgcctc ccgggttcac gccattctcc 37324
 tgccctcagcc tcccagtag ctgggactac aggagccccg cactgcacca ggccaatttt 37384
 tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac tgtgttagcc aggatggtct cgatctcctg 37444
 acttcgtgat ccgccacct cggccttcca aagtgtcggg attacaggcg tgagccactg 37504
 cgcccagccg ctaattttca tatttttagt aaaaacaggg ttccaccatg ttggccaggc 37564
 tagtcttgaa ctccgaacc caagtgatcc tcctgccttg gcctcccaaa gtgctgggat 37624
 tacagacacc acacctggct attattattt tttagagaca ggggtgctgct ctatcttcca 37684
 gctgtagtg cagtgcagcc tccatcatag ctgctgcag ccttgacctc ctgggttcac 37744
 gtgatcgtcc cgcctaagcc tctggaggag ctgggagtac tggcatgtgc caccatgcct 37804
 ggttaatttt tttttttttt tttttgagac agagtctcat tctgtcacc aggctggagt 37864
 gcgggtggtg gatcttggct tactgaaacc tccacctccc aggttccagc aattctcctg 37924
 cctcacct ctgagtagct gggattacag gttccggcta ccaaacctgg ctagtttttg 37984
 tatgtttagt agagacaggg ttccaccatg ttggtgaggc tggctctgat tctccgcct 38044
 cagcctccca aagtgtggg attacaggct tgagccaccg tgccctggctt tttttttttt 38104
 tttttttttt gtggcaataa ggtctcattg tcttgcccag gctagcctta tgctcctagc 38164
 ctcaagtgat cctcctccct cagcctccca aagtgtggg attacagggtg ggcgccactg 38224
 tgccctgttc cgttgggagg tcttttccac cctctttttc tgggtgcctc ctctggctca 38284
 gccgcaccct gcaggatgac acaaggggat ggggaggcac tcttgggttc atcgacgggt 38344
 cccctctgac cccctgacct cgctccccgg acccccag gc tcc atc gcc tac ctc 38399
 ly ser ile ala tyr leu
 375 380
 ttc ttc acc aac cgg cac gag gtc agg aag atg acg ctg gac cgg agc 38447
 phe phe thr asn arg his glu val arg lys met thr leu asp arg ser
 385 390 395
 gag tac acc agc ctg atc ccc aac ctg agg aac gtg gtc gct ctg gac 38495
 glu tyr thr ser leu ile pro asn leu arg asn val val ala leu asp
 400 405 410
 acg gag gtg gcc agc aat aga atc tac tgg tct gac ctg tcc cag aga 38543
 thr glu val ala ser asn arg ile tyr trp ser asp leu ser gln arg
 415 420 425
 atg atc tgc ag gtgagcgtcg cccctgcctg cagccttggc ccgcaggatga 38594
 met ile cys se
 430



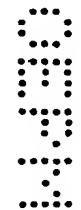
gatgagggct cctggcgctg atgcccttct ctctctctgc ctacg c acc cag ctt 38649
r thr gln leu 435
gac aga gcc cac ggc gtc tct tcc tat gac acc gtc atc agc aga gac 38697
asp arg ala his gly val ser ser tyr asp thr val ile ser arg asp
440 445 450
atc cag gcc ccc gac ggg ctg gct gtg gac tgg atc cac agc aac atc 38745
ile gln ala pro asp gly leu ala val asp trp ile his ser asn ile
455 460 465
tac tgg acc gac tct gtc ctg ggc act gtc tct gtt gcg gat acc aag 38793
tyr trp thr asp ser val leu gly thr val ser val ala asp thr lys
470 475 480
ggc gtg aag agg aaa acg tta ttc agg gag aac ggc tcc aag cca agg 38841
gly val lys arg lys thr leu phe arg glu asn gly ser lys pro arg
485 490 495
gcc atc gtg gtg gat cct gtt cat gg gtgcgtatcc acgacgctga 38887
ala ile val val asp pro val his gl
500 505
gggctgcaga gggaatggag ggagcaggaa ggagcttcag gaactgggta gtgggctggg 38947
catggtggct caaagcacct gtaatcccag cactttggga ggccaagggtg ggtggatcat 39007
caagaccagc ctgaccaaca tggtgaaacc tcgtctctac taaaaatata aaaattagcc 39067
gggtgtgggtg gtgggcacct gtaatcccag ctgctcggga ggctgaggca ggagaatcac 39127
ttgaacctgg gagatggagg ttgcagttag ccaagacagc ccactgcac tccagcctgg 39187
gtgacagagt gagactccgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa ctaaacaaaa aactgggttag 39247
tggctagaca acaggatggg atcttccaag cccatggctg actcagcagc tcctgggtca 39307
agacactgtg acctgtgtcc cctggcagga agcatcgccc ctgccacctg cccgggtgtac 39367
tctgtacctg tcaggtgaca tctgtacct aagcacgtga gaggtggcat ttcacagttt 39427
cagtgtgggtg ctgacaaccc gggacgcaca ctgtccttgc agctacaatc aggaggtgaa 39487
tgttgggttt ccagcagaga aactgggaga aggcacactt ggtgtctgga agggaaaagc 39547
agggaaagaga gcatcatcag atgcctgcgg gtgaagggtg gcccgctatg gccagcgtcc 39607
ctttttatatt ttattttatt atttatttga gatggaatct cgctctgtcg cccagactgt 39667
agtgcagtgg tgcgatcacg gctcactgca agctccgcct cacagggttca cgccattctc 39727
ctgcctcagc ctcccagta gctgggacta caggcaccgg ccaccacgcc cgggttaattt 39787
tttgcatattt tattagagac ggggtttcac cgcgttagcc aggatggtct aaatctcctg 39847
acctgtgat ccacccgcct cggcctccct aagtgttggt attacaagcg tgagccacca 39907
cgccccggcc cctttttatt ttttttttt tgagacggag tctcgctctg tcgccaggc 39967
tagattgcag tggcgtgatc tcggctcact gcagcctccg cctcccaggt tcaagtgatt 40027
ctcctgcctc aacctccaa ctaattagga ttacaagcat gtaccaccat gctgactaa 40087
ttttttgtat tttttagtaga gactgggttt caccatgttg gctaggctgg tctcgaaccc 40147
ttagcctcaa gtaatctgcc tgcctcagcc tcccaaacag cggggattac aggcattgagc 40207
cactgtgccc aacccaaccc tggatctctt ttaaacaaga caatgctcgc tgttgccaca 40267
gaacaatggg tggggtacat gtggcccagt gtgtttggcc acataactgc caggccagag 40327

ggaaagagac tctcagactg tctccactca gatacaaatg tgtgtgttgt gtgcgtgtgt 40387
 tctgggtctca tatttgtttg ttttgagaca ggggtgctgct ctgtcactga gtctggagtg 40447
 cagtggcgca atcagagttc actgcagcct caaactcttg ggctcagttg attctccac 40507
 ttcagcctcc caagtagctg gaactacagg tgaacaccac tgtgccagc taatttattt 40567
 ttttttagt agagatgagg tctcactatg ttgccaggc tggctcttgac ctccatagcct 40627
 caagcaatcc tcctgccttg gtctccaaa gtgctgggat tacacgtgcg agccattgcg 40687
 catggcttgt gttcttgtgt ttcttcttt ttctttcgag atggcgtctc agtctgccac 40747
 ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcatag ctactgtag cctcaacttc ctgggctcaa 40807
 gcaatcctct tgatttcagc ctcccgggccc tggccagcat ggtgaaaccc cgtctctact 40867
 aaaaatacaa aaatgtagcc aggcgtgggtg gtgggcgcct gtaatcccag ctacaccaga 40927
 ggctgaggga ggagaatcgc ttgagcctgg aaggtggagg ttgcagcaag ccaagatcgt 40987
 gccactgcac tccagcctgg gcaacagaga cagactctgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa 41047
 acccaaaaca gccacatttg gagtttggg ttcccagcag gactatttcc caagcctgag 41107
 cctggctgtt tcttccagaa ttcgttgac gcattggctg ggatcctccc ccgcctcca 41167
 gcctcacagc tattctctgt cctcccacca g c ttc atg tac tgg act gac tgg 41220
 y phe met tyr trp thr asp trp
 510 515
 gga act ccc gcc aag atc aag aaa ggg ggc ctg aat ggt gtg gac atc 41268
 gly thr pro ala lys ile lys lys gly gly leu asn gly val asp ile
 520 525 530
 tac tgc ctg gtg act gaa aac att cag tgg ccc aat ggc atc acc cta 41316
 tyr ser leu val thr glu asn ile gln trp pro asn gly ile thr leu
 535 540 545
 g gtatgttcgc aggacagccg tcccagccag ggccggggcac aggctggagg 41367
 a
 acagacgggg gttgccaggg ggctctggga caagcccaag ctgctccctg aaggtttccc 41427
 tctttctttt ctttgttttt tctttttttg agatgagggtc ttggtctgtc acccaggctg 41487
 gagtgactg gcgcaatcgt agctcactgc agcctccacc tcccaggctc aagtgtacct 41547
 cctgcctcac cctcctgagt agctgagatt acagacacgt gccaccacgg cagactaatt 41607
 ttattttatt tttgggaaga gacaaagtct tgttatgttg gcctggctgg tctcaaactc 41667
 aggggtgcaag cgatcctccc gcctcagcct tccaaactgc tgggattaca ggcgtggggc 41727
 accgtaccca gcctccttga agtttttctg acctgcaact ccctacctg cccattggag 41787
 agggcgtcac aggggagggg ttcaggctca catgtggttg gagctgcctc tccaggtgct 41847
 tttctgctag gtccctggca gggggtcttc ctgccggag cagcgtggcc aggccctcag 41907
 gaccctctgg gactggcatc agcacgtgac ctctccttat ccaattgtgt gtctag 41963
 at ctc ctc agt ggc cgc ctc tac tgg gtt gac tcc aaa ctt cac tcc 42010
 sp leu leu ser gly arg leu tyr trp val asp ser lys leu his ser
 550 555 560
 atc tca agc atc gat gtc aac ggg ggc aac cgg aag acc atc ttg gag 42058
 ile ser ser ile asp val asn gly gly asn arg lys thr ile leu glu
 565 570 575



gat gaa aag agg ctg gcc cac ccc ttc tcc ttg gcc gtc ttt gag 42103
asp glu lys arg leu ala his pro phe ser leu ala val phe glu
580 585 590

gtgtggctta cgtacgagat gcaagcactt aggtggcgga tagacacaga ctatagatca 42163
ctcaagccaa gatgaacgca gaaaactggg tgtgactagg aggaggtctt agacctgagt 42223
tatttctatt ttcttcttcc tttttttttt tttttttgag acagagtttt gctctcgttt 42283
cccaggctgg agggcaatgg catgatctcg gctcaccgca acctccacct cccaggttca 42343
agtgattctc ctgtctcagg ctccccagta gctgggatta caggcatgca ccaccaccat 42403
gcccggctaa ttttgtatct ttagtagaga cggagtttct ccatgttggt caggctgggc 42463
tcgaactccc gacctcaggt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag 42523
acttgagcca ccgcgccag ctatttctgt tttcttctct tcttcttctt cttttttttt 42583
ttctaagaga caggatctca ctctgtcccc aggaggagt gcagtgtgt gatcatagct 42643
cactgcagcc ttaacctcct gggctcaagt gatcttccca cctcagcctc ccaagtagct 42703
ggaactacag gtgcacacca ccatgccag ctcatTTTTtT tttttttttt ttttttgaga 42763
cagtctcggt ctgtcacccc ggctggagtg cagtggatca atcttggtc actgcaacct 42823
ctgcctccca ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagttg agattacagg 42883
catgtgtgcc atcatacctg gctgattttt gtattttttt ttagagatgg ggtctcagta 42943
tgttgaccag gcttgtctta aactcccggc ctcaagtgt cctcccaact cagtctccca 43003
aagtgtggg attacaggca tgagccactg cggccgggtt gtttctttt ttttttctgt 43063
ttttggagac ggaatttcac ctttgttgcc caggatggag tgcaatggca cgatatcgcc 43123
tcaccacaac ctctgcctcc tgggttcaaa ccattttcct gcctcagcct tcttagtagc 43183
tgggattaca agcatgtgcc accacgcccg gctgattttg tttttttagt agagatgggg 43243
tttctccatg ttggccaggc tggctctgaa ctctgacct caggctattc gccacctct 43303
gcctcccaaa gtgtgggat tacaggcgtg agccaccgtg cccgggtggt tgtattcttt 43363
ttactgagag tctgaaagg cagtgatect ctgtcacatg tgatcttggc tctcagggga 43423
catttggaac tttctagaga ttttttggtt gtcacaagtc aatggggaag actggttgga 43483
tttagtgggt agaggctggt gacgtgtgt aacaccaga acagggaagt agcaggccct 43543
agatagagcc atcgtgggga aacctgtct taaggaaatg gcgctatttt ataaccac 43603
gttcttgga tgattacca cagccaaaag tggagtcccc ccaagtgtgt tcttccattt 43663
gcattgcagt aaaggaatag ctgaggccgg gtaatttata aagaaaagag atttaaactg 43723
ggtatggcag tttatgccta taatccaga actttgggag gctgaggcag gaggatcgct 43783
tgagtccagg agtgtgagac cgagaccagc ctggccaaca tgacgaaact ctgtctctac 43843
aaaaaataca aaaagtaggc caggcacggt ggttcacgcc tgtaatcca gcactttggg 43903
aggccgaggc gggcggtatca cgaggtcagg agatcgagac catcctggct aacacggtga 43963
aaccctgtct ctactaaaaa tacaaaaaca aaattagccg ggtgtggtgg caggcgctg 44023
tagtcccagc tactcgggag gctgaggcgg gagaatggcg tgaaccggg aggcggagct 44083
tgagtggc caagatcgcg cactgcact ccagcctggg tgaccgagtt gagactcgt 44143
ctcaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaataca aaaagtagcc aggtgtggtg gcaggcacct 44203
gtaatcctgg gttctcgaga ccgaggcatg agaattgcct gacccagga ggtggaggct 44263
gcagtggcc aagatcatgc cactgcact cagcctgggc gacagagtgg gactctgtct 44323
caaaaaaaca caaaaaaaa gttctgaaa tggatggtgg tgatggtgat acttccaca 44383
cagcgtgaat ctgcttaagg ccaccgaact gtgcactcac aaatagtcga gatggtacat 44443



tttatgttat gtgtatttca ccacaattaa aaactagttg tgggccaggt gtggtggttc 44503
 atgcctgtaa tcccagcact ttgggaggtc agagggaggt ggatcatgag gtcagcagtt 44563
 cgagaccagc caggccaaca tggtgaaacc ccatctctac taaaaataca aaaattagcc 44623
 aggcgtggtg gcacatgcct gtagtcccag ctacttgaga ggctgaagca ggagaatcgc 44683
 ttgaacctgg gaggctaaga ttgcagtga ccgagatcgt gccactgcac tccagcctgg 44743
 acgacagagt gagacttcgt ctcaaaaaaa aaaccaaaaa aaaaattagc tgtgggtcag 44803
 gcactgtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggaga ccgaggtagg tggatggcct 44863
 gaggtcagga gttcgaatcc agcctggcca acatggtgaa agcccgtctc tactaaaaat 44923
 acaaaaaatt agtcaggtat gttggcacac ctgtaatccc agctactcgg gaggtgaa 44983
 caagagaatc gtttgaaccc aggaggtgga cgttgcaagt agccgagatt gggccactgt 45043
 actccagcct gggcaacaaa agtgaaactc tgtctgaaac aaacaaacaa acaaacaaac 45103
 agacaaacaa aaaaactagt tgtggagaga ggggtggcctg tgtctcatcc cagtgtttaa 45163
 cgggatttgt catcttcctt gctgcctgtt tag gac aaa gta ttt tgg aca gat 45217
 asp lys val phe trp thr asp
 595 600
 atc atc aac gaa gcc att ttc agt gcc aac cgc ctc aca ggt tcc gat 45265
 ile ile asn glu ala ile phe ser ala asn arg leu thr gly ser asp
 605 610 615
 gtc aac ttg ttg gct gaa aac cta ctg tcc cca gag gat atg gtt ctc 45313
 val asn leu leu ala glu asn leu leu ser pro glu asp met val leu
 620 625 630
 ttc cac aac ctc acc cag cca aga g gtaaggggtg gtcagcccca 45358
 phe his asn leu thr gln pro arg g
 635 640
 ccccccaac cttgaaacct ccttgtggaa actctggaat gttctggaaa tttctggaat 45418
 cttctggtat agctgatgat ctgcgttctg ccctgactcc gcttcttctg cccag 45474
 ga gtg aac tgg tgt gag agg acc acc ctg agc aat ggc ggc tgc cag 45521
 ly val asn trp cys glu arg thr thr leu ser asn gly gly cys gln
 645 650 655
 tat ctg tgc ctc cct gcc ccg cag atc aac ccc cac tcg ccc aag ttt 45569
 tyr leu cys leu pro ala pro gln ile asn pro his ser pro lys phe
 660 665 670
 acc tgc gcc tgc ccg gac ggc atg ctg ctg gcc agg gac atg agg agc 45617
 thr cys ala cys pro asp gly met leu leu ala arg asp met arg ser
 675 680 685
 tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttggtt ctgcgtcctg tgtcctccaa 45667
 cys leu thr g
 690
 ctgccccctc ctgagcctct ctctgctcat ctgtcaaag ggtacctcaa ggtcgttgta 45727
 aggactcatg agtcgggata accatacttt tcttgatgg acacatcagc accgggcttg 45787
 acatttacc agttcccctt tgatgcctgg tttcctcttt cccggccccc tgaagaggtg 45847
 atctgctc tgacaggagc cctgagggag gaaatggtcc cctttgttga cttttctttt 45907

tctttatttt tttcttttga gatttgctgt caccagcct ggaatgcagt ggtgccatct 45967
 tggctcactg ctacctctcc cactgggttc aagcaattct cctgcctcag cctcccaagt 46027
 agctgggatt acaagcatgc gccaccatgc ctggctaagt tttgtatttt tagtacagac 46087
 agggtttctc catgggtggc aggttggtct tgaactcctg acctcaggtg atcctccac 46147
 ctctgcctcc cgaagtgcta cgattacagg catgagccac cgcgcccatc cccctttgtt 46207
 gacttttctc atcctctgag aaagtctcag ttgaggccag cacctccctc aagtgaattg 46267
 aatctccctt ttgaacaaca acaaataaca atatgaccca gacgtggtgg ctcacacctg 46327
 tggctcccagc tactcgggag gctgaggtgt gaggattgct tgagcccagg aggtcaaggc 46387
 tacagagagc tataatcaca ccacttcaact ccagcctggg ggacaaaagt aaaccctgtc 46447
 tgaaaaaac aaaaaaagaa aaaggaaaaa gaaacaatac gatcacaaag tagatattca 46507
 tagtgtttat tttcagtact cttttttttt tttttttttt tttttgagac ggagtcttgc 46567
 tctgttgccc aggtcggagt gcagtggcac gatcttggt cactgcagcc tctgcctccc 46627
 aggttcaagc gcttggtca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcgc ttcttctgcc 46687
 tcagcctccc cagtagctgg gactataggc acgtccact acgccagct aattttttgt 46747
 attttttagt agagatgggg tttcactatg ttagccagga tggctctgat ctctgacct 46807
 cgtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gttgggatta tgggcatgag ccaactgcacc 46867
 tggccttttt tttttttttt tttgagatgg agtttcgctc ttgttgccca ggctggagt 46927
 caatggtgtg atctcggctc actgcaacct ctgcctcctg ggttcaagca attctcctgc 46987
 ctcagcctcc cgagtagctg ggattacagg cacctgccac cagcctggc taatttttgt 47047
 acttttagta gagacgggtt ttctccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcctgacctc 47107
 aggtgatcca cccacctcgg cctcccaaag ttctgggatt acagacatga gccaccgctc 47167
 ctggcctgtg ctggcctttt ttagttattt cttttttttt tttttttttt tttgagacag 47227
 agtcttactc cgtcgcctcag gctggagtgc agcgggtgca tgtctgcgca ctgcaagctc 47287
 cgcctcctgg gttcatgcca ttctcctgcc tcagcctctt gagtagctgg gactgcaggc 47347
 gcctgccact acgcccggct acttttttgt atatttagta gagatggagt ttcactgtgt 47407
 tagccaggat ggtctcgatc tcctgacttt gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagt 47467
 ctgggattac aggcgtgagc caccatgcca ggcttttttt tttttttttt tttttgagac 47527
 ggagtcttgc tctgtcgccc aggtcggagt gcagtgccat gatctcagct cactgcaagc 47587
 tccacttccc aggtcagcgc cattctccag cctcagcctc ccaagtagct gagactacag 47647
 gggcccgcca ccacactcgg ctaatttttt tgtattttta gtagagacgg ggtttcacca 47707
 tgttagccag gctggtcttg aactcctaac ctcaggcgat tcacctgct cggcctccca 47767
 aagtgtggg attaaaggta tgagccacct cgcctggtgt gagccacctc gccagcctg 47827
 agccacctca cccagcctaa gccactgtgc ctggcctgat tttggacttt ttaaaaattt 47887
 tattaataat tatttttggg tttctttttt ttgagacagg gtcttactct gtcacccagg 47947
 ccatcctgtc tgtctgtcat cccagtgatg ggatcatacc ttgctgcagc ctctacctcc 48007
 tgggctcaag cgatcctccc cctcagcct cctgagtagc tgggagtaca ggtgtgcacc 48067
 accacacctg gctaattttt tttttttttt ttgtatatag agatggtatt ttgccatgtt 48127
 gaccaggcta gtcttaaact cctggactca ctcaagagat cctcctgct tggcctccca 48187
 aggtcatttg agactttcgt cattaggcgc acacctatga gaaggcctg caggcacgtg 48247
 gcactcagaa gacgtttatt tattctttca g ag gct gag gct gca gtg gcc acc 48301

lu ala glu ala ala val ala thr

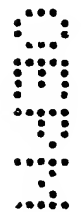
cag gag aca tcc acc gtc agg cta aag gtc agc tcc aca gcc gta agg 48349
 gln glu thr ser thr val arg leu lys val ser ser thr ala val arg
 705 710 715

aca cag cac aca acc acc cga cct gtt ccc gac acc tcc cgg ctg cct 48397
 thr gln his thr thr thr arg pro val pro asp thr ser arg leu pro
 720 725 730

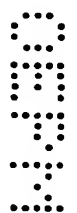
ggg gcc acc cct ggg etc acc acg gtg gag ata gtg aca atg tct cac 48445
 gly ala thr pro gly leu thr thr val glu ile val thr met ser his
 735 740 745

caa g gtaaagactg ggccctccct aggccctct tcaccagag acgggtccct 48499
 gln a
 750

tcagtggcca cgaacatttt ggtcacgaga tggagtccag gtgtcgtcct cactcccttg 48559
 ctgaccttct ctcaattggg ccgtgtgtct ctgggccctc agtttcccta tctgtaaagt 48619
 gggctctaata acagttcttg ccctctttgc aaggattaaa tgggccaaat catatgaggg 48679
 gccaggtcct tcaggctcct ggttcccaaa gtcagccacg caccgtgtgg gtcccaaaat 48739
 tttatcaagg cacattcgtt gcctcagctt caggcatctg cccaaaaagg ccaggactaa 48799
 ggcaaggaga gggagggatt cctcagtact cagcttttca cagaggctcc aaaaggctaa 48859
 ggaatccagt aacgttttaa cacaatttta caattttttt ttttgagacg gagttttgct 48919
 cttgttgccc aggtctggagt gcagtggcac gatctcggct cactgcaacc tctggctccc 48979
 gggttcaagc gattctcctg cctcagtctc ccgagtagct gggattacag gcatgcgcca 49039
 ccacgctcgg ctaattttgt attttttagta cagaaggggc ttctctgttg gtcaggctgg 49099
 tcgtgaactc tcaacctcag gtgagccacc cgcctgagcc tcccaaagtg ctgggattac 49159
 aggtgtgagc caccacgctt ggctttttt ttgagacaga gtctcgtctt cgcccatgct 49219
 gtactgcagt gacgcagtct gggctcactg taacctccgc tcccagggtt caagtgattc 49279
 ttctgccga gcctcccatg tagagtagct gggattacag gcaccgcca ccatgcctgg 49339
 ctaattcttg catttttagt agagatgggg ttccacagtg ttggccaggc tgggtctcaa 49399
 cttctgacct caagtcatct gcctgccttg gccctgccaa agtgcctggga ttatagatgt 49459
 gagccaccgc gcctggccta cagtttatte tttggtggct cacacctgta atctcagcac 49519
 tttgggaggc caagtgaggga gaatggcttg agcccaggag ttcaagtcca gcctgggcaa 49579
 catagcaaga ccctatctct actacaaaat aaataataaa taaactaatt ttttttcttt 49639
 taaaacccaa ctattcaaca tggcaatgca atatattaaa aaaatttttt ttttctttga 49699
 aacggagtct ctcactgtca cccgggctgg agtgcagtgt cgccatcttg gctcactgca 49759
 acctccgct cccaggcca agtgattctc ctgcttcagc ctcccagta gctgggatta 49819
 caggcaccga ccaccatacc cagctaatat ttttgtattt ttagtagaga tggggtttca 49879
 ctatgttggg caggctggtc tggaactcct gacctcgtga tctgcccgag gatcggcggc 49939
 ctcccaaagt gctggggatt gcaggcatga gccaccgtgc ccagccaaaa cttttttatt 49999
 tttatttttt tgggacacgg tctcactgtg taccacagac tggagtgata gagtgtgtc 50059
 atggctcact gcagcctcaa cctccctggg ctccaggtgat ctccctgctt cagtctccca 50119
 ggtagctggg actacaggca tgagccacca caccagcta atttttgaat tttttttag 50179
 agacagggtt tcacctgtg gccagactt gtctctaact ccagggtca agcagatctgc 50239
 ccaccttggc ctcccaaagt gctgagatta atgcaattta aaaaattttt tggccaggcc 50299



tgggtggctca tgccctgtatt cacaacacct tgggaggcaa aggtgggcag atcacttgag 50359
gtcaggagtt cgagactagc ctggccaaca tggtgaaacc ccctgtctac taaaaaata 50419
caaaaattac ctgggcacag tgggtgggtgc ctgtaatccc agctacttgg gatgctgagg 50479
gtggagaatt gcttgaacct gggaggcaga agttgcagta agccaagatc atgpcactgg 50539
actccagcct cagtgcaga gcaaaactct gtctccaaaa aaattgtttt tttttttttt 50599
ttttcaaate atcacactac agccaaggcc tggccactta cttttgtaaa taaagtttta 50659
ttggagccag tggaccagtg aggccgaate ttgcagggtg aagatcacag tctatccttg 50719
aaaattttga tattttgttc attgggtggg ttttcattaa tttaaatttt aaaaaataac 50779
atattaaagg ctggtgtgga ggtgcacgcc tgcagtccta gctactccca gaggctgagg 50839
cgggagactt gcttgagccc aagagttgaa gtccagcctg ggcaacatag cgagaccccc 50899
atctctaaaa ataaaaataa tgcattagaa tattattgga ttccctgggca gggcacagtg 50959
gctcacacct gtaatcccag cactttggga ggctgagggtg ggtggatcac ctgagggtcag 51019
gagtttgaga ccagcctggc caacatggtg aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaat 51079
tagccaggcg tgggtggcagg tgccctgtaat ccagctact cgggagggtg aagcacgaga 51139
atcgcttgaa tccaggaggc ggaggttgca gtgagctgag attgcgccat tgcactccag 51199
cctggaggac aagagtgaat ctccattccc ctctgcaaag aaaaggaata ttatcagatt 51259
cctaagcttt ttggctcccc ctttagtttg ggggctgggg tggtgagtgt ctgacctggc 51319
ctcactgtcc tccctggatg tgatgagacc cagggtgtggg tcaggatgtc attcgtttgt 51379
ccaccagagg gcgccccaaac tgctttgagc tgctgggaaa tgggtgctcct agacttttag 51439
caaacaaaca aaaaaaatg gcacatcggc aaatttcaga ccattctttt tttttttttt 51499
tttggttcca gagtagctga aatctttgtt cagttacaag caggataaaa tggaaactgc 51559
ctgggagagg ctgagaaacc ttcttgcttg ggggagggtg ggcaactgcta gaattaatcg 51619
cttcacagac cagcccatcc aggactcctc aaatttgcca aaaaagccat tcattcattc 51579
attcatttat gtagagacga gggggatctg gctatattgc ctgatttgtt ctcaaattcc 51739
tggcctcaag tgatcctcct gccttgggtc actaatgtgc tgcgattaca ggcatgagcc 51799
accgtgccta gctctagtgg acttgaaatg ttgccttgcc caggggccctt atgttgaaatg 51859
gccaggtcc acttgatagg ttctgtacca aggttaaccc catcccataa tgccctgggac 51919
agttgatgca ggacaatcag ctctctgtgc attcaacctc aggactgagc atgctgggca 51979
ttgtggggtc cgaagggtgc tcccctgtcc cttcaaaaat accctctttt tcttttcttc 52039
tttttttttt tttttttttt ctgagacgaa gtcttgctct gttgccccag ctgagagtga 52099
gtggtgcat ctcagctccc cgcaacctct gcttcccggg ttcaggcgat tctcctgcct 52159
cagcctcctg agtagctggg attacagggtg cccaccgcca cagctggcta atttttgtat 52219
ttttagtaga gacagggttt caccgtgttg gccaggctgg tcttgaactc ctgacctcag 52279
gcaacctgcc cacctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggtttgagc cactgggcct 52339
ggcctttttt tttttttttt gagagggagt ctcactctgt tgcccaggct ggagtgaat 52399
ggcgcgatct tgactcactg caactccatt tcccgggttc aagtgattct cctccctcag 52459
cctcccaagt agctgggatt acagggtgat gccaccacgg ccagctaatt ttgtattttt 52519
agtagagaca gggtttctact atgttgatca tgctggtctc aaactcctga ccttaggtga 52579
tctgcccgcc ttagcctccc aaagtgttg gattacagggt gtgagccacc gcgcccagac 52639
caaaatatgc tcatttttaat aaaatgcaca agtaggttga caagaatttc acctgcaacc 52699
ttgtcaacca cctagaataa aagcctctgc agccctcccc taaagactca tcaatgtgag 52759
gctcaagaac cttcttaggc tgggctcggg ggctcatttc tgtaatccct gcactttgga 52819



aggctgaggc aggaggatct cttgaggcca ggagttcaag acaagcctgg gcaacatagc 52879
cagacctctg tttctatccc ccacaaaaag aaccttctta aaccggaatt gagtcctaca 52939
acctcgataa ctcacaaaata agcccgtgtg gcctctcaca gacttgggaa gttctccaag 52999
tgtccaggga gatgtgccag gcgctttcct gccgtgacca ccgtcctctg cctgctccat 53059
ttcttggtgg ccttccttta gacctgggcc tcaactcttg ttctctcctg cag ct ctg 53117

la leu

750

ggc gac gtt gct ggc aga gga aat gag aag aag ccc agt agc gtg agg 53165
gly asp val ala gly arg gly asn glu lys lys pro ser ser val arg

755

760

765

gct ctg tcc att gtc ctc ccc atc g gtaagcgcg gcccgtcccc 53210
ala leu ser ile val leu pro ile v

770

775

cagcgtcccc caggtcacag cctcccgtta tgtgacctcg tgccctggctg gttgggcctg 53270
ttcacttttt ctcctggaca gggaacagcc ccactggtgt cctttatcac cccacggcc 53330
tctcctggct tggggctgac agtgacaaga tcagacagct aaggggtcag atggaggatg 53390
tgagctggg tcccgtgctg tggaatagcc tcaccgagat ttgagtgcct tctggggaac 53450
tggttccctt gcagggggct gtgtggagag gcgcgctctc cctgectcac ccatgctcat 53510
cctaactcgg ttaccatcac atctcttttt tctttttttc ttaaatttta agaaaaaaga 53570
aatttaattt ttttgagaga cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca 53630
ccatcatgcc tcgctgcagc ctcaatgtct gggctcaagc gatcctccca cctcagcctc 53690
ctgagtagct ggtgcaagcc actatacccc acttcctatt tcttaaaaag tcacagccct 53750
gtgtgtggct aatcctggac agaaatctag aagaagtcag ctacttctgg ggcgtggctc 53810
accagtgagg cttcagggtta gatatttctt atacttatga ggctgggtgt ggtggcttat 53870
gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga agtgggtgga ttgcttgggc tcaggagttc 53930
gagaccaacc tgggcaacat ggcgaaaccc tgtttctaga aaagggtacaa aaattagctg 53990
ggcaggtggc acgtgcctgt ggtaccagct acttgagggc ctgaggcagg aggatcgctt 54050
gaacctggga ggtcgaggtt gcagtgaact gagatcatgt cactgcactc cagcctgggtg 54110
acagagcaag accccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaattctt atgcatagat 54170
ttgctctttt tctgtttgtt tgttttgaga tggagtctcg ctctgtcgcc caggctggag 54230
tacagtggct caacctcggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag caattctcct 54290
gcctcagcct cctgagtagc tgggactaca gcgccgcca ccatgccag ctaatttttg 54350
tatttttagt agagactgac tgggtttcat catgttgcc aggtggtct cgaactcttg 54410
acctcatgat ccgccgcct cagcctccca aaatgctggg attacaggcg tgagccacca 54470
ggcccaggcc gcaaggcgat ctctaataaa acataaaaaga ccaggagtca aggttatggt 54530
acgatgccc tgttttcact ccagccacgg agctgggtct ctggtctcgg gggcagctgt 54590
gtgacagagc gtgcctctcc ctacag tg ctc ctc gtc ttc ctt tgc ctg ggg 54642

al leu leu val phe leu cys leu gly

780

gtc ttc ctt cta tgg aag aac tgg cgg ctt aag aac atc aac agc atc 54690
val phe leu leu trp lys asn trp arg leu lys asn ile asn ser ile

785

790

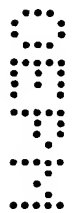
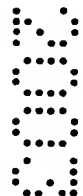
795

800

```

aac ttt gac aac ccc gtc tat cag aag acc aca gag gat gag gtc cac 54738
asn phe asp asn pro val tyr gln lys thr thr glu asp glu val his
      805                      810                      815
att tgc cac aac cag gac ggc tac agc tac ccc tcg gtgagtgacc 54784
ile cys his asn gln asp gly tyr ser tyr pro ser
      820                      825
ctctctagaa agccagagcc catggcggcc ccctcccagc tggaggcata tgatcctcaa 54844
gggaccaggc cgaggcttcc ccagccctcc agatcgagga cagcattagg tgaatgcttc 54904
tgtgcgctca ttcagaatgt cagcggacaa tggccttggt ggtgtagagg aatggttgat 54964
aagcaaatag agagctccat cagatggtga cagggcaaag aaagtcaaaa ggagttcaga 55024
ggccggggcgc ggtggctcat gcctgtaatc ccaggacttt gggaggccga ggctggcgga 55084
tcacctgaag tcaggagttt gagaccagct tggccatcat gacaaaaccc cgtctctatt 55144
aaaaatacaa aaaattagcc aggcgtggga gtgggcgcct gtaatcccag ctactcggga 55204
ggccgaggga gaaaaatcgc ttgaacctag gaggcagagg ttgcagtga cagagatcgc 55264
gccactgcat tccagcccgc gaggaagag caaaactcca tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 55324
ggagttcaga ggcccgcat ggtggttcac acatgtgatc ccagaacttg gggaggttga 55384
ggcaggagaa tcacctgagc tcagagttca agaccagcct gggcagcaca gcaagacccc 55444
atctctgcaa aaaataaaaa ttagcccgag tgtggtgatg agcgcctagt tccagctact 55504
agggaggcta aggcaggagg attgcttgag gctaaggtag gagattgaga ctgcagtga 55564
ttgtgattgc gtcactgccc tccagcctgg gtgacagagc aagcccttgt ctcttaaaaa 55624
aaaaaaaaaa ttcaaagaag ggtttccaga gggccaggag ggaggaaggg agaggagggtg 55684
ttttattttt ttgcttttat tttttatttt gagacagagt ctctctctgt caccaggtt 55744
ggagtgcagt gctgtgatct tggctcactg caacttctgc ctctggggtt caagcaattc 55804
ttatgcctca gcctcagcct cctgagtagc tgggattaca acactatgcc cgggtaattt 55864
ttgtattttt agtagagacg aggtttcgcc atgttgccca gactggtctc gaactcctga 55924
cctcaagtga tccaccgcgc ttggcctccc cacgtgctgg gattgcaggc gtgagccact 55984
gcgcccgcct tgatctttac acaaggggtt tagggtagggt agccttctct gaaccaggag 56044
aacagcctgt gcgaaggccc tgaggctgga ccgtgcctgt tgggtttgag gccgttgtag 56104
ctggagcaaa cagagagagg ggtaaaaagg caggaggcta ccaggcaggt tgtgcagagc 56164
cttgtgggcc actggggagg actttggctt ttgcctgag agcgggtggga agtgactgaa 56224
tccggtactc accgtctccc tctggcggtc cctgggggaa catgcttggg gatcaggctg 56284
ggggaggctg ccaggcccag gaggtgagaa gtaggtggcc tccagccgtg tttcctgaat 56344
gctggactga tagtttccgc tgtttaccat ttgttggcag aga cag atg gtc agt 56399
                                arg gln met val ser
                                830
ctg gag gat gac gtg gcg tgaacatctg cctggagtc cgtccctgcc 56447
leu glu asp asp val ala
      835                      839
cagaaccctt cctgagacct cgccggcctt gttttattca aagacagaga agaccaaagc 56507
attgcctgcc agagctttgt tttatatatt tattcatctg ggaggcagaa caggcttcgg 56567
acagtgccca tgcaatggct tgggttggga ttttggtttc ttcctttcct cgtgaaggat 56627
aagagaaaca ggcccggggg gaccaggatg acacctccat ttctctccag gaagttttga 56687

```



gtttctctcc accgtgacac aatcctcaaa catggaagat gaaaggggag gggatgtcag 56747
gccagagaa gcaagtggct ttcaacacac aacagcagat ggcaccaacg ggacccctg 56807
gccctgcctc atccaccaat ctctaagcca aaccctaaa ctgaggagtc aacgtgttta 56867
cctcttctat gcaagccttg ctgacagcc aggttagcct ttgccctgtc acccccgaat 56927
catgaccac ccagtgtctt tcgaggtggg ttgtacctt ccttaagcca ggaaagggat 56987
tcattggctc ggaaatgac tggctgaatc cgtggtggca ccgagacca actcattcac 57047
caaagtatgc cacttcccag aggcagagcc tgagtactg gtcaccctta atatttatta 57107
agtgcctgag acaccgggtt accttggccg tgaggacacg tggcctgcac ccaggtgtgg 57167
ctgtcaggac accagcctgg tgcccatcct cccgaccct acccacttcc attcccggtg 57227
tctccttgca ctttctcagt tcagagttgt aactgtgtta catttggcat ttgtgttatt 57287
atattgcaact gttttctgtc gtgtgtgttg ggatgggac ccaggccagg gaaagcccg 57347
gtcaatgaat gccggggaca gagaggggca ggttgaccgg gacttcaaag ccgtgatcgt 57404
gaatatcgag aactgccatt gtcgtcttta tgtccgccca cctagtgtt ccacttctat 57467
gcaaatgcct ccaagccatt cacttcccc aatctgtcgt tgatgggtat gtgttataaa 57527
catgcacggt gaggccgggc gcagtggctc acgcctgtta tcccagcact ttgggaggcc 57587
gaggcgggtg gatcatgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac gtgaaacccc 57647
gtctctacta aaaatacaaa aaattagccg ggcgtggtgg cgggcacctg tagtcccagc 57707
tactcgggag gctgaggcag gagaatggtg tgaacccggg aagcggagct tgcagtgagc 57767
cgagattgag cactgacgt ccgcagtctg gcctgggcca cagagcgaga ctccgtctca 57827
aaaaaaaaa acaaaaaaaaa accatgcatg gtgcatcagc agcccatggc ctctggccag 57887
gcatggcgag gctgagggtg gaggatggtt tgagctcagg catttgaggc tgcctgagc 57947
tatgattatg ccactgcttt ccagcctggg caacatagta agacccatc tcttaaaaaa 58007
tgaatttggc cagacacagg tgcctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggtgagc 58067
tggatcactt gatttcagga gttggagacc aggcctgagc aacaaagcga gatcccatc 58127
ctacaaaaac caaaaagtta aaaatcagct gggtagcgtg gcacgtgcct gtgatccag 58187
ctacttggga ggctgaggca ggaggatcgc ctgagccag gaggtggagg tgcagtgag 58247
ccatgatcga gccactgcac tccagcctgg gcaacagatg aagaccctat ttcagaaata 58307
caactataaa aaaataaata aatcctccag tctggatcgt ttgacgggac ttcaggttct 58367
ttctgaaatc gccgtgttac tgttgcaactg atgtccggag agacagtgc agcctccgtc 58427
agactcccgc gtgaagatgt cacaagggat tggcaattgt ccccaggga aaaaactgt 58487
gtcccccca gtgcaggga ccgtgataag ctttctggt ttcggagcac gtaaatgcgt 58547
ccctgtacag atagtggga ttttttgtta tgtttgcaact ttgtatattg gttgaaactg 58607
ttatcactta tatatatata tatacacaca tatatataaa atctatttat ttttgcaaac 58667
cctggttgct gtatttgttc agtgactatt ctgggggcc tgtgtagggg gttattgcct 58727
ctgaaatgcc tcttctttat gtacaaagat tatttgacg aactggactg tgtgcaacgc 58787
tttttgggag aatgatgtcc ccgttgtatg tatgagtggc ttctgggaga tgggtgtcac 58847
tttttaaac actgtataga aggtttttgt agcctgaatg tcttactgtg atcaattaaa 58907
tttcttaa at gaaccaattt gtctaaactc gatgcacgtt cttctgttcg cgcgcttctt 58967
tttgtttttt ttttttctc gagatggagc ctggctctgt caccctggc tggagtgcag 59027
tggcatgac tcggcttact gcaagctccg cctccagggt tcaagcaatt ctccgtgcctc 59087
agcctcccta gtagctagga ttacaggtga gtgccaccac gcctggccaa tttttttttt 59147
tttttttttt ttgagacaga gtctcgtctc gtcaccagc ctggagtgc gtggtgtgat 59207



ctcgggtcac tgcaagctct gcctcccagg ttaatgccat tctcctgtct cagcctcctg 59267
agtagctggg gccacaggcg cctgccacca cgcccggtta attttttttt gtacttcttt 59327
tagtacagac ggggtttcac catgttagcc aggatggctt cgatctcctg accttgatgat 59387
ccacctgctt cggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgggtggcca 59447
acgctaattt ttttgttttt ttagatggag tcttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag 59507
tggtgtgatc tctgcctact gcaagctccg cctcccgggt tcatgccatt ctctgcctc 59567
agcctcctga gtaactggga ctacaggcac ccgccaccac gcccggttaa ttttttgat 59627
tttttagtaga gacaggggtt caccgtgtta gccaggatgg tcttgatctc ctgaccttg 59687
gatccacccg tctcggcctc ccaaagtgtt gggattagag gtgtgagcca ccacacctgg 59747
cctagcctgg ctaatttttg tatttttggg agagacgggg tttcaccatg ttggtcaggg 59807
tggtcttgaa cttctgacct caggtaatct gcctgcctca gtctcccaa gtgctgggat 59867
tacaggtgtg agccaccgag cctggcctca ctctctctct tcatctgttt gtggattgga 59927
ctcccagga gaaggaccca gaaggggaag actcccagaa ctccgggcaa gatgcaatct 59987
ccgtgggctg cca 60000

<210> SEQ ID NO.: 2

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex1F

<400>

cacattgaaa tgctgtaaat gacg

<210> SEQ ID NO.: 3

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex1R

<400>

ctattctggc gcctggagca agcc

<210> SEQ ID NO.: 4

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex2F

<400>

ttgagagacc ctttctcctt ttcc

<210> SEQ ID NO.: 5

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex2R

<400>

gcatatcatg cccaaagggg

<210> SEQ ID NO.: 6

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex3F

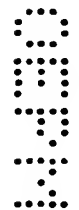
<400>

ttcctttgag tgacagttca atcc

<210> SEQ ID NO.: 7

<211> 24

<212> polinucleótido



<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex3R

<400>

gataggctca atagcaaagg cagg

<210> SEQ ID NO.: 8

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut191-2F

<400>

acagttcaat cctgtctctt ctct

<210> SEQ ID NO.: 9

<211> 10

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4AF

<400>

gtggtctcgg ccatccatcc

<210> SEQ ID NO.: 10

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<223> Ex4ARF

<400>

agccatcttc gcagtcgggg

<210> SEQ ID NO.: 11

<211> 12

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut 509insCR

<400>

cgagccatct tcgcagtcgg ag

<210> SEQ ID NO.: 12

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4BF

<400>

ccccagctg tgggcctgcg

<210> SEQ ID NO.: 13

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

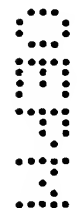
<220>

<221> cebador

<223> Ex4BR

<400>

cgccccacc ctgccccgcc



<210> SEQ ID NO.: 14

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex6F

<400>

tctctccttcc tctctctggc

<210> SEQ ID NO.: 15

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex6R

<400>

tctgcaagcc gctgcaccg

<210> SEQ ID NO.: 16

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> MutC255GF

<400>

ctctggctctc acagtgacac gc

<210> SEQ ID NO.: 17

<211> 20

<212> polinucleótido



<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut E291XR

<400>

gcaccgagac tcaccgcaat

<210> SEQ ID NO.: 18

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex7F

<400>

ggcgaaggga tgggtagggg

<210> SEQ ID NO.: 19

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex7R

<400>

gttgccatgt caggaagcgc

<210> SEQ ID NO.: 20

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<223> Ex9F

<400>

cccctgacct cgctccccgg

<210> SEQ ID NO.: 21

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex9R

<400>

gctgcaggca ggggcgacgc

<210> SEQ ID NO.: 22

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex10F

<400>

atgcccttct ctctctctgc

<210> SEQ ID NO.: 23

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex10R

<400>

agccctcagc gtcgtggata



<210> SEQ ID NO.: 24

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut1432delGF

<400>

gggacatcca ggcccccgcc

<210> SEQ ID NO.: 25

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11F

<400>

tcctcccccg cctccagcc

<210> SEQ ID NO.: 26

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11R

<400>

gctgggacgg ctgtcctgcg

<210> SEQ ID NO.: 27

<211> 20

<212> polinucleótido



<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex13F

<400>

gtcatcttcc ttgctgcctg

<210> SEQ ID NO.: 28

<211> 30

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex13R

<400>

ttccacaagg aggtttcaag gttggggggg

<210> SEQ ID NO.: 29

<211> 13

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> MutH635NR

<400>

acctcttggc tgggtcaggt tct

<210> SEQ ID NO.: 30

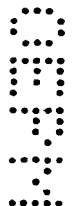
<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<223> Ex14F

<400>

aaattttctgg aatcttctgg

<210> SEQ ID NO.: 31

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex14R

<400>

gcagagagag gctcaggagg

<210> SEQ ID NO.: 32

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut2140+1G>AR

<400>

gaaacaaggc gtgtgccaga

<210> SEQ ID NO.: 33

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex15F

<400>

gaagggcctg cagcacgtgg ca



<210> SEQ ID NO.: 34

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex15R

<400>

tagggagggc ccagtcttt

<210> SEQ ID NO.: 35

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex17F

<400>

gggtctctgg tctcgggggc

<210> SEQ ID NO.: 36

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex17R

<400>

ggctctggct ttctagagag gg

<210> SEQ ID NO.: 37

<211> 23

<212> polinucleótido



<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggtcggga cactgcctgg cag

<210> SEQ ID NO.: 38

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggtcggga ccctgcctgg cag

<210> SEQ ID NO.: 39

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgccaggca gtgtcccgac ccg

<210> SEQ ID NO.: 40

<211> 23

<212> polinucleótido

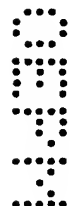
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgccaggca gggcccgac ccg



<210> SEQ ID NO.: 41

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atgcatttcc cgtcttggca ctg

<210> SEQ ID NO.: 42

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gatgcatttc cctcttggca ctg

<210> SEQ ID NO.: 43

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gatgcatttc ccgtcttggc actgg

<210> SEQ ID NO.: 44

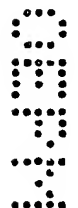
<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

agatgcattt ccctcttggc actgg

<210> SEQ ID NO.: 45

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtctcttct gtagtgtctg tcacc

<210> SEQ ID NO.: 46

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtctcttctg tctgtgtctg tcacc

<210> SEQ ID NO.: 47

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

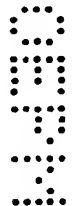
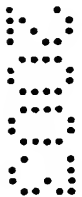
ctgtctcttc tgtagtgtct gtcacct

<210> SEQ ID NO.: 48

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

tgtctcttct gtctgtgtct gtcacct

<210> SEQ ID NO.: 49

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggccgtgtca accgtgcat tcc

<210> SEQ ID NO.: 50

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gccgtgtcaa ccgtgcatt c

<210> SEQ ID NO.: 51

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aggaatgcag cgtttgacac ggccc

<210> SEQ ID NO.: 52

<211> 27



<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaggaatgca gcgtttgaca cggcccc

<210> SEQ ID NO.: 53

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgtgggg gccgtgtcaa ccg

<210> SEQ ID NO.: 54

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgtgggg gcgtgtcaac cgc

<210> SEQ ID NO.: 55

<211> 23

<212> polinucleótido

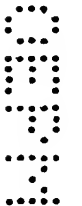
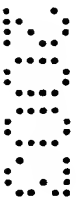
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttgacac ggccccaca gct



<210> SEQ ID NO.: 56

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggttgaca cgccccaca gct

<210> SEQ ID NO.: 57

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaggctgtc gtaagtgtgg c

<210> SEQ ID NO.: 58

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaaggctgt cgtaagtgtg gcc

<210> SEQ ID NO.: 59

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

caaggctgtc gttaagtgtg gcc

<210> SEQ ID NO.: 60

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aaggctgtcg ttaagtgtgg c

<210> SEQ ID NO.: 61

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggtgctca cctgtggtcc cgcc

<210> SEQ ID NO.: 62

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggtgctca cccgtggtcc cgcc

<210> SEQ ID NO.: 63

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

cggtgctcac ctgtgggtccc gc

<210> SEQ ID NO.: 64

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggtgctcac ccgtgggtccc gc

<210> SEQ ID NO.: 65

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacaacgacc ccgactgcga agatg

<210> SEQ ID NO.: 66

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacaacgacc cccgactgcg aagat

<210> SEQ ID NO.: 67

<211> 23



<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc cgactgcgaa gat

<210> SEQ ID NO.: 68

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc ccgactgcga aga

<210> SEQ ID NO.: 69

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc atccgagcca tct

<210> SEQ ID NO.: 70

<211> 23

<212> polinucleótido

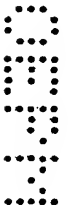
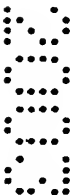
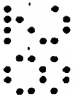
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc acccgagcca tct



<210> SEQ ID NO.: 71

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcgggccact catccgagcc atctt

<210> SEQ ID NO.: 72

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcgggccact caccgagcc atctt

<210> SEQ ID NO.: 73

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccagctggcg ctgtgatggt ggc

<210> SEQ ID NO.: 74

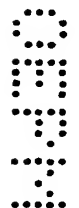
<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

ccagctggcg ccgtgatggt ggc

<210> SEQ ID NO.: 75

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccagctggc gctgtgatgg tggcc

<210> SEQ ID NO.: 76

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccagctggc gccgtgatgg tggcc

<210> SEQ ID NO.: 77

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgcaaggac aaatctgacg aggaa

<210> SEQ ID NO.: 78

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

ctgcaaggac aactgcggtg tgggc

<210> SEQ ID NO.: 79

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actgcaagga caaatctgac gaggaag

<210> SEQ ID NO.: 80

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actgcaagga caactgcggt atgggcg

<210> SEQ ID NO.: 81

<211> 25

<212> polinucleótido

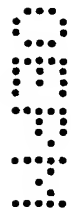
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaatctgac gaggaagact gcggt



<210> SEQ ID NO.: 82

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaatctgac gacaaatctg acgag

<210> SEQ ID NO.: 83

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaaatctga cgaggaaaac tgcggta

<210> SEQ ID NO.: 84

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaaatctga cgacaaatct gacgagg

<210> SEQ ID NO.: 85

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

gggtccctcg cagagtgtca ctg

<210> SEQ ID NO.: 86

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggtccctcg ccgagtgtca ctg

<210> SEQ ID NO.: 87

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgggtccctc gcagagtgtc actgt

<210> SEQ ID NO.: 88

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

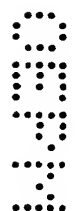
tgggtccctc gccgagtgtc actgt

<210> SEQ ID NO.: 89

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

aacccatcaa agagtgcggt gag

<210> SEQ ID NO.: 90

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aacccatcaa atagtgcggt gag

<210> SEQ ID NO.: 91

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaacccatca aagagtgcgg tgagt

<210> SEQ ID NO.: 92

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaacccatca aatagtgcgg tgagt

<210> SEQ ID NO.: 93

<211> 20



<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcactctcgg gccctacca

<210> SEQ ID NO.: 94

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcactctcgg acccctaccc a

<210> SEQ ID NO.: 95

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactctcggg cccctaccc

<210> SEQ ID NO.: 96

<211> 19

<212> polinucleótido

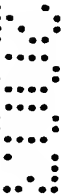
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactctcgga cccctaccc



<210> SEQ ID NO.: 97

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgagtgcct gtgcgccgac ggctt

<210> SEQ ID NO.: 98

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgagtgcct gtacgccgac ggctt

<210> SEQ ID NO.: 99

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgagtgcctg tgcgccgacg gct

<210> SEQ ID NO.: 100

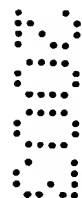
<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

cgagtgcctg tacgccgacg gct

<210> SEQ ID NO.: 101

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgaagatgc gaaggtgatt ccgg

<210> SEQ ID NO.: 102

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccagcga agatttccgg gtggg

<210> SEQ ID NO.: 103

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

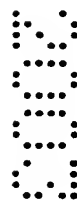
agcgaagatg cgaaggtgat ttccggg

<210> SEQ ID NO.: 104

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

tggcccagcg aagatttccg ggtggga

<210> SEQ ID NO.: 105

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgaagaagag gtaggcgatg g

<210> SEQ ID NO.: 106

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttggtga agacgatgga g

<210> SEQ ID NO.: 107

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

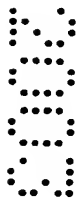
<221> cebador

<400>

gtgaagaaga ggtaggcgat gga

<210> SEQ ID NO.: 108

<211> 23



<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagacgatgg agc

<210> SEQ ID NO.: 109

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctccatcgcc tacctcttct tcacc

<210> SEQ ID NO.: 110

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctccatcgcc taactcttct tcacc

<210> SEQ ID NO.: 111

<211> 27

<212> polinucleótido

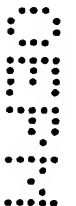
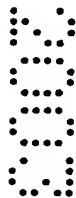
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccatcgcc ctacctcttc ttcacca



<210> SEQ ID NO.: 112

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccatcgc ctaactcttc ttcacca

<210> SEQ ID NO.: 113

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgccggttg tgaagaagag gtagg

<210> SEQ ID NO.: 114

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgccggttg gtgagaagag gtagg

<210> SEQ ID NO.: 115

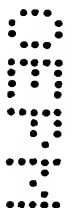
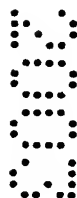
<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

gtgccgggttg gtgaagaaga ggtaggc

<210> SEQ ID NO.: 116

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgtgccgggtt ggtgagaaga ggtaggc

<210> SEQ ID NO.: 117

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caatagaatc tactgggtctg acctg

<210> SEQ ID NO.: 118

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

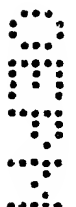
caatagaatc tagtgggtctg acctg

<210> SEQ ID NO.: 119

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

gcaatagaat ctactggctt gacctgt

<210> SEQ ID NO.: 120

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaatagaat ctagtggctt gacctgt

<210> SEQ ID NO.: 121

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccccgac ggctggctg tggac

<210> SEQ ID NO.: 122

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

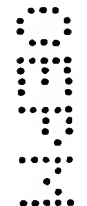
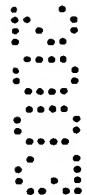
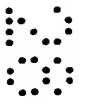
<221> cebador

<400>

ggcccccgac ggctggctgt ggact

<210> SEQ ID NO.: 123

<211> 25



<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccacagcc agcccgtcgg gggcc

<210> SEQ ID NO.: 124

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agtccacagc cagccgtcgg gggcc

<210> SEQ ID NO.: 125

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc cccagtcagt ccagt

<210> SEQ ID NO.: 126

<211> 25

<212> polinucleótido

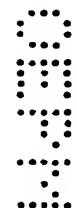
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc cctagtcagt ccagt



<210> SEQ ID NO.: 127

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggagttcc ccagtcagtc cag

<210> SEQ ID NO.: 128

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggagttcc ctagtcagtc cag

<210> SEQ ID NO.: 129

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtccccag aggatatggt tctct

<210> SEQ ID NO.: 130

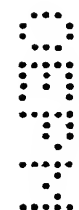
<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

ctgtccccag agaatatggt tctct

<210> SEQ ID NO.: 131

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccccaga ggatatgggt ctc

<210> SEQ ID NO.: 132

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccccaga gaatatgggt ctc

<210> SEQ ID NO.: 133

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

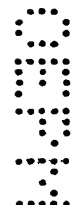
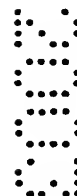
tggttctctt ccacaacctc acc

<210> SEQ ID NO.: 134

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

tggttctctt caacaacctc acc

<210> SEQ ID NO.: 135

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggttctct tccacaacct caccc

<210> SEQ ID NO.: 136

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggttctct tcaacaacct caccc

<210> SEQ ID NO.: 137

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

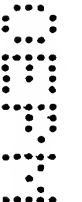
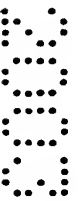
<221> cebador

<400>

gctgaccttt agcctgacgg tggat

<210> SEQ ID NO.: 138

<211> 25



<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgacctt tagctgacgg tggat

<210> SEQ ID NO.: 139

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgacctt tagcctgacg gtggatg

<210> SEQ ID NO.: 140

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagctgacct ttagctgacg gtggatg

<210> SEQ ID NO.: 141

<211> 23

<212> polinucleótido

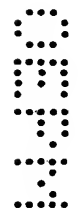
<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgetcctcgt cttcctttgc ctg



<210> SEQ ID NO.: 142

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctcctcgg ggtctttgcc tgg

<210> SEQ ID NO.: 143

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgctcctcg tcttcctttg cctgg

<210> SEQ ID NO.: 144

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgctcctcg ggtctttgct ctggg

<210> SEQ ID NO.: 145

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador



<400>

gactcacage acgtctcctg ggact

<210> SEQ ID NO.: 146

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gactcacage acatctcctg ggact

<210> SEQ ID NO.: 147

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actcacagca cgtctcctgg gac

<210> SEQ ID NO.: 148

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

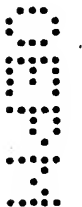
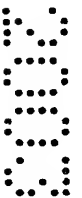
actcacagca catctcctgg gac

<210> SEQ ID NO.: 149

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

ccatcgtggc agcgaaactc gtc

<210> SEQ ID NO.: 150

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atgcacttcc cacgtcctgg gag

<210> SEQ ID NO.: 151

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

catcgtggca gcgaaactcg t

<210> SEQ ID NO.: 152

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcacttccc acgtcctggg a

